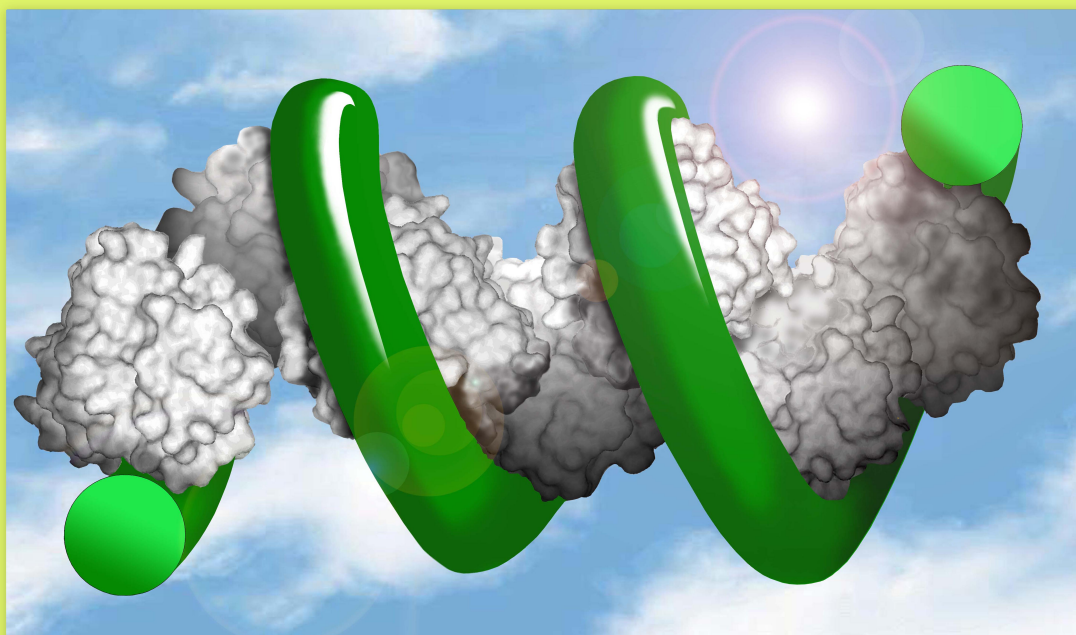




FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
DE LA PROTEÍNA p6 CON EL DNA
DEL BACTERIÓFAGO Φ 29 DE
*Bacillus subtilis***



TESIS DOCTORAL

MARTÍN ALCORLO PAGÉS

Madrid, 2007



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
DE LA PROTEÍNA p6 CON EL DNA
DEL BACTERIÓFAGO Φ 29 DE
*Bacillus subtilis***



TESIS DOCTORAL

MARTÍN ALCORLO PAGÉS

Madrid, 2007

Ilustración de portada: interpretación del modelo p6-DNA de Serrano *et al.*, 1993a



FACULTAD DE CIENCIAS

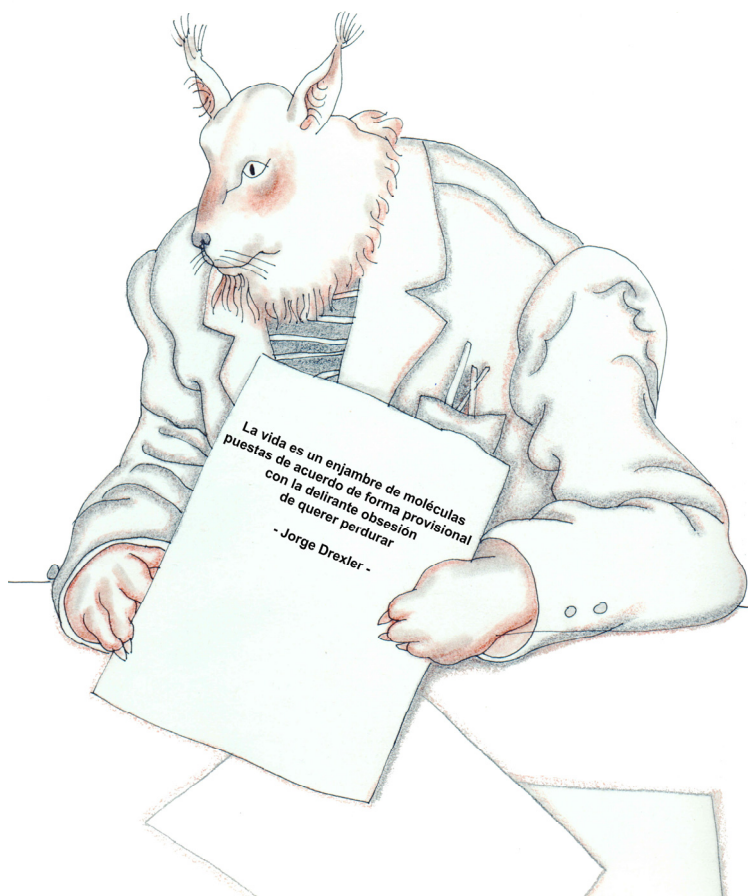
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
DE LA PROTEÍNA p6 CON EL DNA
DEL BACTERIÓFAGO Φ 29 DE
*Bacillus subtilis***

Memoria presentada por Martín Alcorlo Pagés para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Enero 2007.

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” bajo la dirección del Doctor José Miguel Hermoso Núñez y la tutoría de la Doctora Margarita Salas Falgueras. Para su realización se ha contado con una beca de formación de profesorado universitario del Ministerio de Educación y Ciencia.

*A mis padres Carmen
y Manolo
A mi hermana Paloma*



La vida es un enjambre de moléculas
puestas de acuerdo de forma provisional
con la delirante obsesión
de querer perdurar
- Jorge Drexler -

Nadie dijo que fuera fácil...

AGRADECIMIENTOS

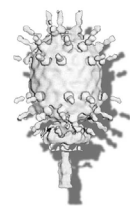
El presente trabajo no habría sido posible sin la ayuda e intervención de numerosas personas a todas las cuales les quiero mostrar mi más sincero y profundo agradecimiento. A la Doctora Margarita Salas Falgueras por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por su preocupación por la calidad del trabajo realizado y por su continuo apoyo. Al Doctor José Miguel Hermoso Núñez por su labor de dirección del presente trabajo, por las sugerencias y ayuda recibidas y por inculcarme la importancia del sentido crítico, sobre todo con uno mismo. Al Doctor Víctor González-Huici por la ayuda prestada durante mis primeros días en el laboratorio, cuando hacer una PCR es todo un reto personal y por su colaboración en el capítulo 1 de esta tesis doctoral. Al Doctor Wilfred Meijer por su ayuda y sugerencias en la parte concerniente al capítulo 3 de esta tesis y por su conversación siempre estimulante. Al Doctor Germán Rivas por su entusiasmo e implicación en la parte correspondiente al Capítulo 4 de esta tesis, así como a los Doctores Carlos Alfonso y Mercedes Jiménez por su ayuda en los experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación. A la Doctora Alicia Bravo por enseñarme las técnicas básicas de clonaje y transformación y por estar siempre dispuesta a ayudar y aconsejar. Al Doctor Mauricio Mateu por su generosidad a la hora de utilizar su fluorímetro así como por estar siempre dispuesto a responder todo tipo de dudas. A los Doctores Luís Blanco y Miguel de Vega, por todas esas consultas para las que siempre me habéis dado respuesta. A José María Lázaro por su inestimable ayuda a la hora de purificar la proteína p6 de GA-1 y por enseñarme que el trabajo casi siempre se puede hacer de forma más práctica. A Laurentino Villar por aguantar con buena cara los numerosos asaltos al coomassie y otras golosinas moleculares. A todas las personas de nuestro grupo con las que día a día comparto el trabajo, con especial cariño a Laura e Irene que son las personas con las que más tiempo he pasado en este microcosmos que es nuestra primera planta, por esas cañas y finos y alguna que otra risa que nos hemos echado. A M^a Ángeles Villarraso por su siempre buena disposición e increíble eficiencia; sin ti, la vida de los becarios sería mucho más difícil. A los servicios de Secuenciación y Fermentación del CBM y, en definitiva, a toda la gente del centro, incluyendo a los que ya no están (porque se han ido a otros lugares ya que España no se acaba donde hay mar, hay barcas para seguir), y que de una forma u otra contribuyen a hacer la vida más fácil, con humor y un poco de ironía basal.

Fuera de la esfera profesional quiero agradecer el apoyo siempre continuo de mis padres Carmen y Manolo y mi hermana Paloma. A vosotros simplemente os debo todo lo que soy y por parecerme un poco más a vosotros lucho cada día. Así que no me ha quedado más remedio que dedicaros mi, hasta ahora, obra más conceptual. Por supuesto también incluyo al resto de mi familia en especial a mi tía Charo y a mi tío Chinarro. Estas líneas quedarían incompletas si no mencionara mi otra familia; Marquetes, Vladimir, Olguita (esos madrugones), Jorge y Violeta, con la que he cruzado montañas, mares, océanos, desiertos y penínsulas, del globo y de la vida, en la calma y en la tempestad. Cuantas noches sin dormir, por aquí y por allí, cuantas vivencias imposibles hemos tenido y sólo espero que sigamos teniendo. El viaje continúa mientras aguante la maquinaria. Como siempre, es imposible mencionar a todas las personas que uno desearía pero no me olvido de los compañeros de Pelayo (Alvarito y Deivid) y de un vasto crisol de personajes increíbles que sucintamente menciono, como Javi Kaner, Raky, la Toñi, Michael de la Montagne, Cristain, la Roci, las princesas de Eguilaz, Elena y Ana, Pablo Gómez, Jorge el colmenareño y el grupo que va desde Pachán hasta su hermana “la otra Vio” de forma que, todos en conjunto, habéis dado sentido a mi vida. Me siento enormemente afortunado de haberos conocido a todos y cada uno de vosotros. Por último quería agradecer en especial, a mi peroné izquierdo, el haberse roto en el momento más apropiado y ser catalizador definitivo que me sentó a escribir esta tesis, eso sí, con el “Gimme shelter” de fondo.

SUMMARY

Protein p6 of *Bacillus subtilis* bacteriophage Φ 29 is essential for phage development. It activates the initiation of DNA replication and promotes the early to late transcriptional switch. These activities require the formation of a nucleoprotein complex in which the DNA forms a right-handed superhelix wrapping around a multimeric protein core. However, there was no evidence of p6 binding to Φ 29 DNA *in vivo*. In this work, protein p6 binding to DNA has been studied by crosslinking, chromatin immunoprecipitation (X-ChIP) and real-time PCR. The results have shown that protein p6 binds to most, if not all, the viral genome *in vivo*, although with higher affinity for both DNA ends, which contain the replication origins. The p6 binding to different Φ 29 DNA regions is modulated by the structural properties of their nucleotide sequences and the higher affinity for DNA ends is possibly related to the presence of sequences in which their bendability properties favour the formation of the p6-DNA complex. Moreover, protein p6 binds to Φ 29 DNA with higher affinity than plasmid DNA. This specificity could be due to the p6 binding preference for less negatively supercoiled DNA. Thus, the p6 binding dependence on DNA topology could explain its preferential binding to viral with respect to plasmid or bacterial DNA, whose level of negative supercoiling is presumably higher than that of Φ 29 DNA. Protein p6 binding to Φ 29 DNA is greatly increased when negative supercoiling is decreased by novobiocin. The fact that gyrase is required for viral DNA replication indicates that, although non-covalently closed, the viral genome is topologically constrained *in vivo*. Viral proteins p1 and p17 seem to be required to restrain the proper topology of Φ 29 DNA. Binding of protein p6 all along the Φ 29 genome strongly suggests that its functions in replication and transcription control could be outcomes of a more global role as a *histone-like* protein. The *in vivo* interaction with DNA of protein p6 of the Φ 29-related bacteriophage GA-1 has been also studied with the finding that it has a much lower dependence on supercoiling than Φ 29 p6 and that is able to bind to Φ 29 DNA, although it does not functionally replace the Φ 29 counterpart. We have taken advantage of the binding properties of protein p6 to monitor the entry of Φ 29 DNA into the cell by X-ChIP, measuring p6 binding to both viral genome ends. With this approach, we have studied the Φ 29 DNA ejection mechanism, demonstrating that the early viral membrane protein p16.7 is required, together with protein p17, for efficient execution of the second pull step of Φ 29 DNA ejection. Finally, the quantitative *in vitro* characterization of reversible protein p6-DNA association in solution, in terms of stoichiometry, affinity and cooperativity, has been carried out using analytical ultracentrifugation. This analysis has shown that p6-DNA complex formation could be fitted by the empirical Hill function. The effect of macromolecular crowding on the p6-DNA complex formation has been also studied using sedimentation equilibrium analysis.

Abreviaturas y términos **en inglés**



ABREVIATURAS Y TÉRMINOS EN INGLÉS

ABREVIATURAS

A: adenina

Å: amstrong, diezmillonésima parte de un metro

Amp^R: resistencia a ampicilina

AO: aspartato oxidasa

Ble^R: resistencia a fleomicina

BSA: seroalbúmina bovina

C: citosina

CIAP: fosfatasa alcalina (*"Calf intestine alkaline phosphatase"*)

Cm^R: resistencia a cloramfenicol

C-terminal: extremo carboxilo

DBP: proteína de unión a DNA de banda doble (*"double strand binding protein"*)

DEAE: dietilaminoetano

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): desoxinucleósido (desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, desoxitimidina) 5' trifosfato

Da/KDa: dalton/Kdalton

D.O_x: densidad óptica a la longitud de onda "x"

dsDNA: DNA de banda doble (*"double strand DNA"*)

DTT: ditiotreitól

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EtOH: etanol

F: emisión de fluorescencia

F_{OBS}: fluorescencia emitida a una determinada concentración de proteína

f_A: relación entre la F_{OBS} y la concentración de proteína presente en el ensayo

G: guanina

g: gramo

h_c: repetición helicoidal de superficie

H_c: repetición helicoidal absoluta

Hpa: heparina-agarosa

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

IC: coeficiente de inmunoprecipitación
IPTG: isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
IND: inducido
Kb: Kpares de bases
 K_{eff} : constante efectiva de unión
 K_m : constante Michaelis-Menten
 L_k : número de enlace ("*linking number*")
MCS: lugar de clonaje múltiple ("*multiple cloning site*")
m.d.i.: multiplicidad de infección
min: minuto
ml: mililitro
mm: milímetro
l: litro
LB: Luria-Bertani
n: tamaño del sitio de unión
 n : índice de cooperatividad de la función empírica de Hill
nm: nanometro
Nal: ácido nalidíxico
ng: nanogramo
 μ g: microgramo
Nov: novobiocina
N-terminal: extremo amino
nt: nucleótido
ORC: complejo de reconocimiento del origen de replicación en organismos eucarióticos ("*Origin Recognition Complex*")
ORF: fase de lectura abierta ("*Open Reading Frame*")
ori: origen de replicación
P: promotor
PCR: reacción en cadena de la polimerasa ("*polymerase chain reaction*")
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
pb: par de bases
PBS: tampón fosfato-salino
PEI: polietilenimina
PMF: fuerza protón-motriz

PNK: polinucleótido quinasa

P(SA): *pellet* de sulfato amónico

p/v: peso/volumen

Q_{\max} : valor máximo del apantallamiento de la fluorescencia

RBS: sitio de unión del ribosoma ("*Ribosomal Binding Site*")

repU: proteína de iniciación de la replicación de los plásmidos pPR54 y pPR55

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo

SA: sulfato amónico

SD: Shine-Dalgarno

SDS: dodecil sulfato sódico

SHV: sobrenadante de "alta velocidad"

SPEI: sobrenadante con presencia de polietilenimina

SSB: proteína de unión a DNA de banda simple ("*single strand binding protein*")

ssDNA: DNA de banda simple ("*single strand DNA*")

TBE: tris-borato EDTA

Tc^R: resistencia a tetraciclina

TP: proteína terminal

Tris: trihidroximetil-aminometano

TT: terminador de la transcripción

UDG: Uracil-DNA glicosilasa

UV: luz ultravioleta

V: voltaje

vs: versus

v/v: volumen/volumen

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

TÉRMINOS EN INGLÉS

Bead: cuenta, forma globular.

Footprint: ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I o radical hidroxilo que permite la identificación de zonas (secuencias) de unión de proteínas al DNA ("huellas").

Hairpin: horquilla, estructura secundaria de doble banda formada por un ssDNA o ssRNA, donde dos regiones de la molécula hibridan entre sí quedando conectadas por un lazo de hebra sencilla.

Histone-like: proteínas “similares a histonas”.

Linking number, *Twist* y *Writhe*: La relación existente entre *Linking number*, *Twist* y *Writhe* viene dada por la siguiente ecuación:

$$L_k = T_w + W_r$$

donde L_k (“*Linking number*”) representa las veces que una de las cadenas de DNA (de doble banda) se envuelve sobre la otra. T_w (“*Twist*”) se define como el número de vueltas completas (360°) de la espiral plectonémica o hélice del DNA. Finalmente, W_r (“*Writhe*”), representa la cantidad de vueltas de sobreenrollamiento existentes en una molécula de DNA circular. En la naturaleza, las moléculas circulares de DNA (el cromosoma bacteriano, plásmidos y algunos DNA víricos), se encuentran habitualmente superenrolladas negativamente.

Loop: fragmento de DNA con forma de lazo.

Lower: señala la posición de hibridación de un oligonucleótido “corriente abajo” en una secuencia de DNA.

Nick: ruptura de un enlace fosfodiéster en una de las cadenas de un DNA de banda doble.

Pellet: sedimento.

Pull: tirar; en esta tesis hace referencia a la segunda etapa del proceso de inyección en la que se tira activamente del DNA viral.

Push: empujar; en esta tesis hace referencia a la primera etapa del proceso de inyección en la que el DNA es impulsado gracias a la energía acumulada debido a su alto estado de empaquetamiento en el interior de la cápsida viral.

Shell: carcasa, caparazón; en esta tesis hace alusión a un método para modelar el volumen y forma de una macromolécula mediante el empleo del programa HYDRO.

Sliding-back: “deslizamiento hacia atrás”. Se utiliza este término en DNAs lineales con proteínas terminales iniciadoras de la replicación, para describir el “retroceso” del complejo de iniciación cuya síntesis ha sido dirigida por el

nucleótido anterior al terminal del molde, lo que permite aparearse con éste y permitir la replicación íntegra del DNA.

Spot blot: metodológicamente idéntico al *Western blot* con la diferencia de que las proteínas son directamente fijadas sobre membrana sin ser separadas por electroforesis.

Upper: señala la posición de hibridación de un oligonucleótido “corriente arriba” en una secuencia de DNA.

Western blot: transferencia a membrana e inmunodetección de proteínas específicas, tras ser separadas mediante electroforesis.

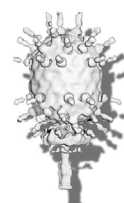
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Organización topológica del cromosoma bacteriano.....	2
Figura 2. Mapa genético y de transcripción de $\Phi 29$ (grupo I, 19285 pb).....	5
Figura 3. Modelo del mecanismo bifásico de “push-pull” de la inyección del DNA de $\Phi 29$	8
Figura 4. Mecanismo de replicación del DNA de $\Phi 29$	10
Figura 5. Repetición helicoidal absoluta (H_c) y repetición helicoidal de superficie (h_c) en un complejo multiproteico-DNA.....	13
Figura 6. Estructuras adoptadas por una superhélice de DNA alrededor de un núcleo multiproteico.....	14
Figura 7. Modelo del complejo proteína p6-DNA.....	15
Figura 8. Aglomeración macromolecular en los compartimentos celulares.....	17
Figura 9. Representación de la pérdida del volumen excluido en un evento de asociación.....	18
Figura 10. Identificación de las secuencias de DNA unido específicamente a una proteína.....	26
Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones del DNA del fago $\Phi 29$	29
Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones del DNA del fago GA-1.....	29
Figura 11. Construcción de recombinantes del plásmido pACYC184.....	32
Figura 12. Construcción y clonaje de secuencias concatémicas en pUC19.....	34
Figura 13. Construcción del plásmido recombinante pT7-4 + gen6(GA-1).....	35
Figura 14. Construcción del plásmido recombinante pPR54 + gen6(GA-1).....	36
Figura 15. Inducción de la proteína p6 de GA-1 en células de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	38
Figura 16. Resumen de las etapas de la purificación de la proteína p6 de GA-1.....	40
Figura 17. Esquema de la obtención y valoración del antisuero contra la proteína p6 de GA-1.....	41
Figura 18. Esquema de las dos aproximaciones experimentales en las técnicas de ultracentrifugación analítica: velocidad y equilibrio de sedimentación.....	44
Figura 19. Localización genómica de las regiones del DNA de $\Phi 29$ analizadas para medir la unión de la proteína p6 <i>in vivo</i>	50
Figura 20. Detalle de la región promedio analizada para estudiar la unión de p6.....	50
Figura 21. Unión de la proteína p6 al DNA de $\Phi 29$ <i>sus14</i> (1242).....	51
Figura 22. Mapa de los plásmidos pPR55w6 y pPR55ow6.....	53
Figura 23. Efecto de la novobiocina y el ácido nalidíxico en la unión de p6 al DNA de $\Phi 29$ <i>sus14</i> (1242).....	54
Figura 24. Efecto de la novobiocina y ácido nalidíxico en la replicación del DNA de $\Phi 29$	55
Figura 25. Replicación del DNA de $\Phi 29$ <i>sus14</i> (1242) <i>in vivo</i>	57
Figura 26. Síntesis de DNA viral en los mutantes <i>sus1</i> (629) y <i>sus17</i> (112).....	58
Figura 27. (A) Síntesis de proteína p6 en células infectadas con los mutantes <i>sus1</i> (629) y <i>sus14</i> (1242). (B) Síntesis de proteína p6 en células infectadas con los mutantes <i>sus17</i> (112) y <i>sus14</i> (1242).....	60
Tabla 3. Unión de p6 en el mutante <i>sus1</i> (629).....	61

Tabla 4. Unión de p6 en el mutante <i>sus17(112)</i>	62
Figura 28. Inducción termosensible de la síntesis de proteína p6 en células de NF-1.....	64
Figura 29. Mapa del plásmido pACYC184 y posicionamiento de las regiones P1' y P2.....	65
Figura 30. Unión de la proteína p6 a las secuencias clonadas en el plásmido pACYC184 en <i>E. coli</i> NF-1.....	66
Figura 31. Espectro de emisión de fluorescencia del triptófano de la proteína p6 en presencia y ausencia de DNA.....	67
Figura 32. Efecto de la temperatura en la interacción p6-DNA.....	68
Figura 33. Efecto de la concentración de MgCl ₂ en la interacción p6-DNA.....	69
Figura 34. Efecto de la concentración de NaCl en la interacción p6-DNA.....	70
Figura 35. Medida de la unión de la proteína p6 a secuencias de DNA de Φ 29 mediante apantallamiento de la fluorescencia.....	72
Figura 36. Predicción de curvabilidad cada 12 pb en el origen de replicación izquierdo del DNA de Φ 29.....	74
Figura 37. Secuencia de C(24) y concatémicos derivados.....	75
Figura 38. Predicción de curvabilidad en las secuencias concateméricas C(24), 12 CENT, 12 IZQ (A), 11IZQ y C22 (B).....	76
Figura 39. Medida de la unión de la proteína p6 a secuencias concateméricas mediante apantallamiento de la fluorescencia.....	77
Figura 40. Mapa genético y transcripcional del bacteriófago GA-1 (grupo III, 21129 pb).....	80
Figura 41. Secuencia de las proteínas p6 de los fagos Φ 29 y GA-1.....	80
Figura 42. Especificidad de los anticuerpos dirigidos contra la proteína p6 de Φ 29 en el reconocimiento de la proteína p6 de GA-1.....	81
Figura 43. Activación de la iniciación de la replicación por la proteína p6 de GA-1.....	81
Figura 44. Esquema experimental para ensayar la inducción de supervueltas por la proteína p6 sobre DNA plasmídico.....	82
Figura 45. Inducción de supervueltas por p6 de GA-1 (electroforesis monodimensional).....	82
Figura 46. Inducción de supervueltas por p6 de GA-1 (electroforesis bidimensional).....	83
Figura 47. Síntesis de la proteína p6 del bacteriófago GA-1 en células infectadas de <i>Bacillus</i> sp. G1R.....	84
Figura 48. Localización genómica de las regiones del DNA de GA-1 analizadas para medir la unión de la proteína p6 <i>in vivo</i>	85
Figura 49. Unión de la proteína p6 al DNA de GA-1, al DNA plasmídico (P1) y efecto de la novobiocina y el ácido nalidíxico en la unión.....	86
Figura 50. Efecto de la novobiocina y ácido nalidíxico en la replicación del DNA del bacteriófago GA-1.....	87
Figura 51. Expresión dependiente de temperatura de la proteína p6 de GA-1 en <i>B. subtilis</i> 110NA.....	88
Figura 52. Unión de p6 de Φ 29 y GA-1 al extremo derecho de Φ 29 (Φ 6) y la región P1 del DNA plasmídico.....	89
Figura 53. Replicación del mutante <i>sus6(626)</i> en las cepas de <i>B. subtilis</i> 110NA/p6 Φ 29 y 110NA/p6GA-1.....	90
Figura 54. Unión de las proteínas p6 de Φ 29 y de GA-1 al DNA genómico de Φ 29 <i>sus6(626)</i> en <i>B. subtilis</i> 110NA.....	92

Figura 55. Unión de la proteínas p6 de Φ 29 a los extremos genómicos de GA-1 en <i>Bacillus</i> sp. G1R/p6 Φ 29.....	94
Figura 56. Unión de la proteína p6 de Φ 29 a la región P1 del plásmido pPR55w6 en <i>Bacillus</i> sp. G1R.....	94
Figura 57. Síntesis de las proteínas tempranas p16.7 y p17 en las estirpes 110NA/pPR55ow6 y 110NA/pPR55w6.....	99
Figura 58. Localización de los genes 6, 16.7 y 17 en sus respectivos operones.....	101
Figura 59. Cinética de acumulación de proteínas codificadas en el operón temprano derecho para los mutantes <i>sus3</i> (91), <i>sus16.7</i> (48) y <i>sus17</i> (112).....	101
Figura 60. Cinética de acumulación de la proteína p6 en los mutantes <i>sus3</i> (91), <i>sus16.7</i> (48) y <i>sus17</i> (112).....	102
Figura 61. Síntesis de DNA viral en células infectadas por los fagos <i>sus3</i> (91) y <i>sus16.7</i> (48).....	103
Figura 62. La infección es un proceso no sincronizado.....	105
Tabla 5: ICs obtenidos para cada extremo genómico, a cada tiempo post-infección, para los mutantes <i>sus3</i> (91), <i>sus14</i> (1242), <i>sus16.7</i> (48) y <i>sus17</i> (112).....	105
Figura 63. Cinética de inyección del DNA viral en los mutantes <i>sus3</i> (91), <i>sus14</i> (1242), <i>sus16.7</i> (48) y <i>sus17</i> (112).....	106
Figura 64. Comienzo de la replicación del DNA viral en células infectadas por <i>sus14</i> (1242), <i>sus16.7</i> (48) y <i>sus17</i> (112).....	107
Figura 65. Velocidad de sedimentación del complejo p6-DNA genómico de Φ 29.....	112
Figura 66. Interacción de la proteína p6 con el DNA genómico de Φ 29.....	113
Figura 67. Análisis por velocidad de sedimentación del complejo p6-L de Φ 29.....	114
Tabla 6: Resumen de las propiedades hidrodinámicas de p6, L y p6-L.....	115
Figura 68. Análisis mediante equilibrio de sedimentación del complejo p6-L.....	116
Figura 69. Interacción de la proteína p6 con la secuencia L (extremo genómico izquierdo) de Φ 29.....	117
Figura 70. Efecto de la aglomeración molecular en la interacción p6-DNA.....	119
Figura 71. Unión de la proteína p6 a la secuencia L del DNA de Φ 29 en presencia de dextrano y 500 mM NaCl.....	120
Figura 72. Estructura tridimensional de la secuencia C(24) generada mediante el servidor Model.it®.....	125
Figura 73. Localización de los nucleótidos repetidos invertidos en la secuencia concatémica C(24).....	126
Figura 74. Posible mecanismo de interacción entre los monómeros de p6.....	127
Figura 75. Posible mecanismo por el cual la proteína p16.7 podría estar involucrada en el proceso de inyección del DNA viral.....	136
Figura 76. Modelos tridimensionales para el extremo genómico izquierdo de Φ 29 generados a partir del programa HYDRO.....	140

Índice de Materias



ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1. Arquitectura de los genomas: proteínas asociadas al DNA	1
2. Bacteriófago Φ29 de <i>B. subtilis</i>:	
organización genómica, transcripción y replicación	4
2.1. Organización genética y transcripcional del DNA del bacteriófago Φ 29.....	4
2.2. Desarrollo de la infección viral.....	6
2.3. Mecanismo de replicación del DNA de Φ 29.....	8
2.4. El bacteriófago Φ 29 y fagos relacionados.....	10
3. La proteína p6 y la organización del cromosoma de Φ29	11
3.1. La proteína p6 y su papel en la replicación y transcripción del DNA de Φ 29.....	11
3.2. Estructura del complejo proteína p6-DNA.....	12
4. Interacciones macromoleculares en medios aglomerados	16
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	
Materiales	22
1. Plásmidos, estirpes bacterianas y bacteriófagos.....	22
2. Reactivos y antibióticos.....	23
3. Cromatografía.....	23
4. Nucleótidos, oligonucleótidos y DNAs.....	23
5. Proteínas.....	23
6. Adyuvantes.....	24
Métodos	25
1. Condiciones de crecimiento.....	25
2. Interacción p6-DNA <i>in vivo</i> : entrecruzamiento con formaldehído e inmunoprecipitación (X-ChIP) de DNA asociado a la proteína p6.....	25
3. Síntesis de DNA viral.....	30

4. Experimentos de fluorescencia.....	30
5. Clonajes.....	31
5.1. Clonajes en el plásmido pACYC184.....	31
5.2. Construcción y clonaje de las secuencias concateméricas 11IZQ, 12CENT, 12IZQ y C22.....	33
5.3 Clonaje del gen 6 de GA-1 en <i>E. coli</i> BL21.....	35
5.4 Clonaje del gen 6 de GA-1 en <i>B. subtilis</i> 110NA.....	36
6. Transformación de <i>B. subtilis</i> 110NA y YB886 y <i>B. sp.</i> G1R.....	36
7. Tratamiento y purificación de proteínas.....	37
7.1. Electroforesis de proteínas.....	37
7.2. Detección de proteínas mediante “Western-blot”.....	37
7.3. Expresión y purificación de la proteína p6 de GA-1.....	38
8. Obtención de anticuerpos específicos contra la proteína p6 de GA-1.....	39
9. Ensayos de iniciación de la replicación.....	41
10. Cambios topológicos inducidos por la proteína p6 en el DNA del plásmido pUC19.....	42
11. Experimentos de ultracentrifugación analítica.....	42
11.1. Análisis de velocidad de sedimentación.....	44
11.2. Análisis de equilibrio de sedimentación.....	45

RESULTADOS

CAPÍTULO 1. UNIÓN DE LA PROTEÍNA p6 AL

DNA DEL BACTERIÓFAGO Φ29 DE <i>Bacillus subtilis</i>.....	48
1.1. Unión <i>in vivo</i> de la proteína p6 al DNA de Φ 29.....	48
1.2. Efecto del superenrollamiento en la interacción p6-DNA.....	52
1.3. Efecto de las proteínas virales p1 y p17 en la interacción p6-DNA <i>in vivo</i>	55
1.4. Efecto de la secuencia nucleotídica.....	63
1.4.1. Unión de p6 a los extremos genómicos del DNA de Φ 29 clonados en <i>E. coli</i>	64
1.4.2. Unión de p6 a DNA genómico de Φ 29 <i>in vitro</i>	66

1.4.3. Unión de la proteína p6 a secuencias de DNA de $\Phi 29$ <i>in vitro</i>	70
1.4.4. Unión de la proteína p6 a DNA con secuencias concateméricas <i>in vitro</i>	73

CAPÍTULO 2. UNIÓN DE LA PROTEÍNA p6 DEL

BACTERIÓFAGO GA-1 AL DNA.....79

2.1. Purificación de la proteína p6 del bacteriófago GA-1.....	80
2.2. Valoración de la actividad de la proteína p6 de GA-1 purificada.....	81
2.3. Obtención de anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína p6 de GA-1.....	84
2.4. Unión <i>in vivo</i> de la proteína p6 de GA-1 al DNA viral y plasmídico en <i>Bacillus</i> sp. G1R y efecto del superenrollamiento en la interacción.....	84
2.5. Unión de la proteína p6 del bacteriófago GA-1 al DNA del bacteriófago $\Phi 29$ en <i>B. subtilis</i> 110NA.....	87
2.6. Unión <i>in vivo</i> de la proteína p6 de $\Phi 29$ al DNA viral y plasmídico en <i>Bacillus</i> sp. G1R.....	93

CAPÍTULO 3. APLICACIÓN DEL ESTUDIO DE LA

INTERACCIÓN p6-DNA: IMPLICACIÓN DE LA

PROTEÍNA TEMPRANA p16.7 EN EL PROCESO

DE INYECCIÓN DEL DNA VIRAL..... 96

3.1. La expresión ectópica de la proteína p6 afecta a la expresión de las proteínas tempranas bajo control transcripcional del promotor C2.....	98
3.2. La ausencia de la proteína p16.7 provoca un retraso en la síntesis de la proteína p6.....	100
3.3. La proteína p16.7 se requiere para llevar a cabo la etapa de <i>pull</i> de forma eficiente.....	103

CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO p6-DNA

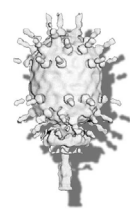
MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA. EFECTO

DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR EN LA

FORMACIÓN DEL NUCLEOCOMPLEJO p6-DNA.....109

4.1. Análisis de la interacción p6-DNA mediante velocidad de sedimentación.....	111
4.1.2. Análisis de velocidad de sedimentación utilizando DNA genómico de Φ 29.....	111
4.1.2. Análisis de velocidad de sedimentación utilizando el extremo genómico izquierdo (L) de Φ 29.....	114
4.2. Análisis de la interacción p6-DNA mediante equilibrio de sedimentación.....	115
4.3. Efecto de la aglomeración macromolecular en la interacción p6-DNA.....	117
DISCUSIÓN.....	121
CONCLUSIONES.....	142
BIBLIOGRAFÍA.....	144

Introducción



INTRODUCCIÓN:

Las funciones biológicas del DNA son dependientes de la formación de complejos nucleoproteicos transitorios que actúan como mediadores de la replicación, la transcripción y la recombinación. En estos procesos cruciales para la célula, el DNA no actúa como un elemento pasivo meramente manejado por proteínas, sino que las características estructurales de las secuencias nucleotídicas determinan direcciones preferentes para que ocurran las transacciones sobre el DNA, como la inducción de curvatura en el eje de la doble hélice o la separación de las dos hebras del DNA. En este contexto, las proteínas que están formando parte de los complejos que interaccionan con los ácidos nucleicos, añaden precisión y control al desarrollo de los procesos, de acuerdo con la idea en la que se afirma que en los sistemas biológicos, nada queda sometido al azar.

1. ARQUITECTURA DE LOS GENOMAS: PROTEÍNAS ASOCIADAS AL DNA

Toda la información acerca de un ser vivo se encuentra almacenada en su material genético, presente en todas y cada una de sus células. Con la excepción de los virus RNA, este material genético es el DNA. En la Naturaleza todos los DNAs aparecen organizados gracias a su asociación con proteínas. En primer lugar por razones meramente espaciales, pues el DNA libre, ocupa un volumen mucho mayor que el intracelular. Gracias a las proteínas que lo compactan, el DNA de *Escherichia coli* reduce su volumen en tres órdenes de magnitud y el de una célula humana en cinco (Holmes y Cozzarelli, 2000). En segundo lugar, porque el transcurso de las transacciones sobre el DNA requiere una estructura ordenada del polímero y la regulación de estos procesos depende, en gran medida, de los cambios en la unión de proteínas al DNA.

El material genético de la mayoría de las bacterias está constituido por una única molécula circular de DNA que no se encuentra alojada en una estructura membranosa, como ocurre en la célula eucariótica, sino embebida en el citoplasma, ocupando una región definida de la célula que funcionalmente es equivalente al núcleo eucariótico y por esta razón se le

suele denominar nucleoide. Las bacterias, como cualquier otro tipo de células, tienen la necesidad de organizar y compactar su material genético para poder confinarlo en su espacio intracelular y reorganizarlo dinámicamente para poder llevar a cabo procesos básicos como el crecimiento, la diferenciación, la segregación cromosómica y la división celular. El cromosoma bacteriano está compuesto por distintos dominios topológicos independientes (Worcel y Burgi, 1972; Pettijohn, 1982; Higgins *et al.*, 1996), como se representa en la Figura 1. Este diseño es vital para la célula porque la energía almacenada en forma de tensión torsional del DNA superenrollado, es la principal fuerza impulsora en todos los procesos celulares que requieren la separación de las dos hebras del DNA, como la transcripción o la reparación, de tal forma que pequeños cambios en la superhelicidad global del DNA cromosómico son letales para el organismo (revisado en Thanbichler *et al.*, 2005a).

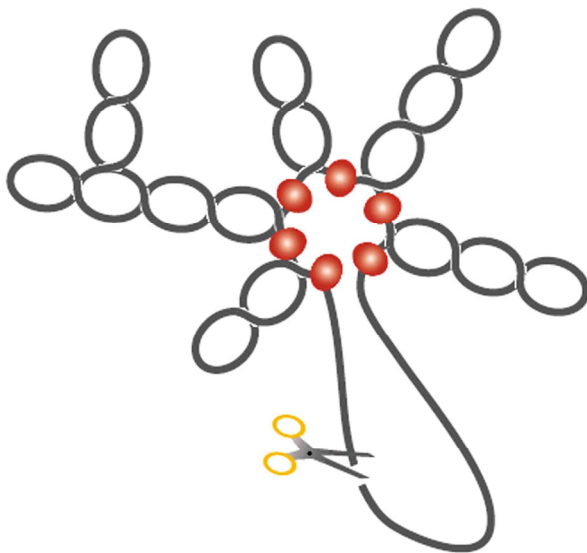


Figura 1: Organización topológica del cromosoma bacteriano. El DNA es compactado en dominios superenrollados individuales, topológicamente aislados unos de otros debido a la presencia de barreras que evitan la difusión del superenrollamiento (elipsoides de color rojo). Por lo tanto, la inducción de cortes en el DNA como consecuencia de procesos celulares o lesiones (tijeras), únicamente relaja uno de los dominios (en el que se ha producido la rotura) sin afectar al estado topológico del resto del cromosoma. Las barreras topológicas están compuestas por proteínas y RNA.

En los organismos eucariotas, las histonas interaccionan inespecíficamente con el DNA para condensarlo en el nucleosoma, unidad básica de compactación. Las modificaciones postraduccionales de estas proteínas, tales como la acetilación, fosforilación, ubiquitinación o ADP-ribosilación modifican su interacción con el DNA. Estos cambios estructurales en el nucleosoma influyen en la accesibilidad del DNA y están directamente relacionados con cambios en el estado transcripcional de los genes, de acuerdo con el estado fisiológico de la célula (revisado en Wolffe y Hayes, 1999). La interacción de las histonas con otras proteínas, tales como las HMG

(“*high mobility group*”), que pueden competir con ellas por la unión al DNA, desempeña también un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. Las HMG se unen al DNA de forma inespecífica de secuencia a través del surco menor, pudiendo inducir curvaturas o distorsiones (revisado en Bustin, 1999). Otras proteínas organizadoras del genoma eucariótico son las SMC (“*structural maintenance of chromosomes*”), ATPasas que intervienen en la condensación y segregación de los cromosomas, así como en la represión génica y en procesos de recombinación. Forman complejos multiproteicos que incluyen subunidades de proteínas diferentes a las SMC, de acuerdo con la función que desempeñen (revisado en Harvey *et al.*, 2002). En su unión a DNA parecen reconocer una característica estructural, tal como una estructura secundaria, en lugar de una secuencia específica. Se ha descrito su capacidad de inducir superenrollamiento positivo en el DNA *in vivo* (Lindow *et al.*, 2002), lo que facilitaría la condensación del DNA. También se han descrito proteínas SMC en bacterias y arqueobacterias, si bien a diferencia de los eucariotas, generalmente presentan un sólo gen *smc*. En el caso de la SMC de *Bacillus subtilis* la proteína se une preferentemente a DNA de banda simple, formando dímeros capaces de enlazar dos hebras (revisado en Hirano, 1999; Holmes y Cozzarelli, 2000).

Las bacterias poseen proteínas similares a las histonas eucarióticas (denominadas “*histone-like*”). Esta similitud no está basada en una homología de secuencia sino en propiedades tales como la unión inespecífica a DNA, bajo peso molecular, elevado número de copias, naturaleza básica y capacidad de alterar la topología del DNA. Normalmente se autoasocian formando oligómeros e intervienen en replicación, transcripción o recombinación del genoma. Los casos mejor caracterizados son IHF (“*integration host factor*”), HU (“*heat-unstable protein*”) (revisado en Swinger y Rice, 2004), Fis (“*factor for inversion stimulation*”) (revisado en Muskhelishvili y Travers, 2003), H-NS (“*heat-stable nucleoid-structuring protein*”) (revisado en Rimsky, 2004) y Dps (“*DNA-binding protein from starved cells*”) (revisado en Ishihama, 1999).

La proteína p6 del bacteriófago $\Phi 29$ de *B. subtilis* es una proteína del tipo *histone-like* que se une al dsDNA del fago. En la presente tesis se han caracterizado distintos aspectos concernientes a la interacción p6-DNA.

2. BACTERIÓFAGO Φ 29 DE *B. subtilis*: ORGANIZACIÓN GENÓMICA, TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN

Los virus son parásitos intracelulares formados por una o varias moléculas de ácido nucleico (DNA o RNA) envueltas por una cápsida proteica. Sólo pueden existir gracias a su capacidad para infectar a las células y utilizar su maquinaria proteica y metabólica para replicar su material genético, con la finalidad de producir numerosas copias del virus original. La infección generalmente culmina con la liberación de las nuevas partículas virales sintetizadas, que de nuevo serán capaces de infectar a otras células, repitiéndose de nuevo el ciclo. Los bacteriófagos son el sistema biológico modelo que permitió el nacimiento de la genética molecular en los años 50 (Cairns *et al.*, 2000). Su biología es muy simple en comparación con la de la célula, fenómeno que los ha convertido en sistemas de estudio para determinar los mecanismos básicos de la transferencia de la información genética. El bacteriófago Φ 29 de *B. subtilis* ha sido profusamente estudiado y constituye un sistema modelo muy apropiado para el estudio de procesos biológicos de gran relevancia, como la replicación y transcripción del DNA así como la morfogénesis de partículas virales (revisado en Salas, 2003). Con el estudio de este sistema nació la Biología Molecular en España (Ávila *et al.*, 2003).

2.1 Organización genética y transcripcional del DNA del bacteriófago Φ 29

El genoma de dsDNA del fago Φ 29 tiene una longitud de 19285 pb (Vlček y Pačes, 1986) con una proteína terminal (TP) de 31 kDa covalentemente unida a cada extremo 5' (Salas *et al.*, 1978), a través de un enlace fosfoéster entre el dAMP y la Ser²³² (Hermoso *et al.*, 1985). En la Figura 2 se muestra el mapa genético (A) y de transcripción (B) de Φ 29, donde los genes tempranos están organizados en dos operones. Uno de ellos, localizado en la región izquierda del genoma, se transcribe desde los promotores A2b y A2c y contiene los genes 56, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. A excepción del gen 4, que codifica un regulador transcripcional (proteína p4) involucrado en el paso de la transcripción temprana a la tardía, los demás genes están implicados en la replicación del DNA de Φ 29, proceso que se detalla en el

apartado 2.3, si bien el gen 6 está también implicado en la regulación de la transcripción. El gen 56 codifica un inhibidor de la Uracil-DNA Glicosilasa celular, que evita el corte de esta enzima sobre un enlace glicosídico del DNA al aparecer un uracilo como consecuencia de la desaminación oxidativa de citosinas (Serrano-Heras *et al.*, 2006). La función de los otros genes se describe en el apartado 2.3.

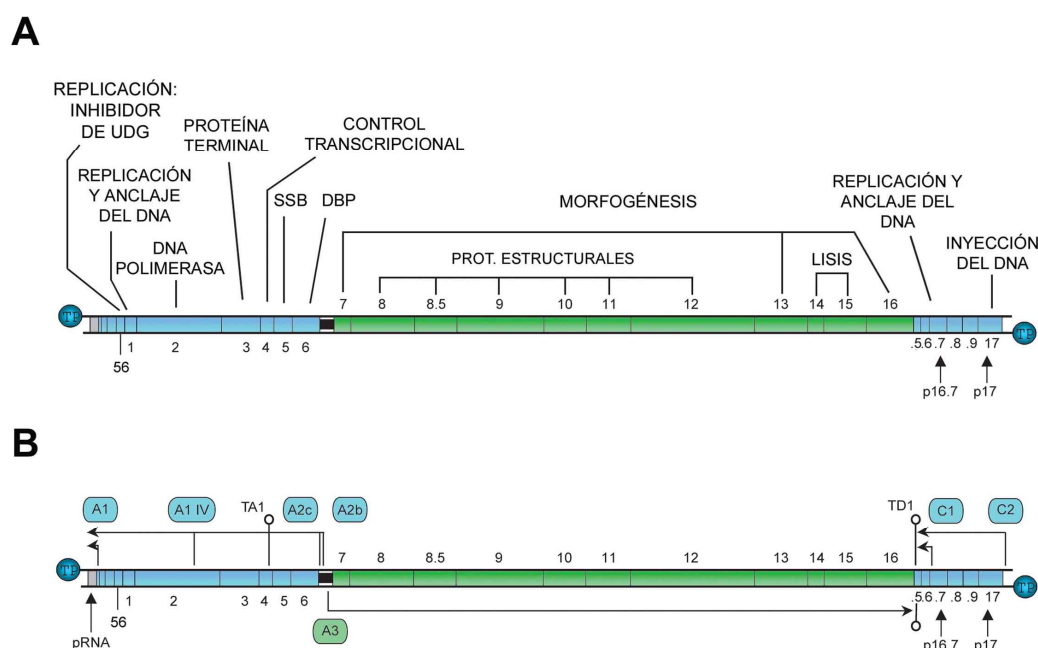


Figura 2: Mapa genético y de transcripción de Φ29 (grupo I, 19285 pb; ver apartado 2.4). Mapa genético (**A**), indicando las proteínas caracterizadas hasta ahora, y de transcripción (**B**), con los genes numerados del 1 al 17 y los principales promotores A1, A1IV, A2b, A2c, A3, C1 y C2, y terminadores, TA1 y TD1, así como los transcritos originados, cuya dirección y tamaño se señala con flechas; la región que codifica el RNA de empaquetamiento (pRNA), transcrito desde A1, se muestra en gris. La región que comprende los promotores A2b, A2c y A3, se señala en negro. Un número significativo de los transcritos procedentes de los promotores A2b y A2c terminan en el terminador de transcripción TA1. El terminador TD1 es bidireccional. Los operones tempranos se muestran en azul y el operón tardío en verde. Las posiciones de las ORFs 16.5, 16.6, 16.8 y 16.9, localizadas en el operón temprano derecho, se representan mediante los números .5, .6, .8 y .9. Los terminadores transcripcionales se representan como estructuras que forman un *hairpin* (†). UDG: Uracil-DNA Glicosilasa.

El otro operón temprano está localizado en la región derecha y se transcribe a partir del promotor C2 codificando las proteínas p17 y p16.7. Recientemente se ha descrito que la proteína p17 participa en el proceso de inyección del DNA viral (González-Huici *et al.*, 2004b), mientras que la proteína p16.7, al igual que la proteína p1, participa en la asociación de la replicación del DNA de Φ29 a la membrana bacteriana (Bravo *et al.*, 2000; Meijer *et al.*, 2001b). También se encuentran en este operón derecho las ORFs p16.5, 16.6, 16.8 y 16.9 cuya caracterización bioquímica aún no se ha llevado a cabo.

Existen además otros promotores tempranos más débiles: el promotor A1, desde donde se sintetiza el RNA de empaquetamiento (pRNA; Guo, 2002), A1IV desde donde se sintetiza la proteína p1 y p56; y el promotor C1, a partir del cual se transcriben las ORFs 16.5 y 16.6 (revisado en Salas y Rojo, 1993). El operón que contiene los genes tardíos está posicionado en la región central del genoma viral y se transcribe a partir del promotor A3. Estos genes tardíos (7, 8, 8.5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16) codifican las proteínas de la cápsida viral, las proteínas involucradas en la morfogénesis del fago y en la lisis celular (revisado en Meijer *et al.*, 2001a).

2.2 Desarrollo de la infección viral

Cualquier proceso de infección comienza con la colisión fortuita entre la partícula viral y la célula huésped, requiriéndose el reconocimiento de una molécula específica localizada en la superficie de la célula (denominada “receptor viral”) que dirige el tropismo del virus (capacidad de un virus para infectar una determinada célula y no otra, revisado en Molineux, 2006). En el caso de $\Phi 29$, el bacteriófago se une de manera lábil a la superficie de la pared de *B. subtilis* en una primera etapa denominada “adsorción reversible”, en la que la partícula viral supuestamente explora la superficie de la pared buscando su receptor específico. El fago $\Phi 29$ utiliza como receptor los ácidos teicoicos glicosilados unidos al peptidoglicano componente de la pared de *B. subtilis* (Young, 1967; Yasbin *et al.*, 1976; Pooley *et al.*, 1987). La interacción con los ácidos teicoicos glicosilados desencadena la siguiente etapa o “adsorción irreversible”, quedando el fago posicionado de forma perpendicular a la superficie celular y anclado de manera irreversible, dispuesto para inyectar su material genético en el interior de la célula huésped (revisado en Molineux, 2006). Este reconocimiento específico se produce a través de la proteína estructural p12 (Villanueva y Salas, 1981), que forma doce apéndices alrededor del cuello del fago, dispuestos a modo de paraguas (Xiang *et al.*, 2006). La proteína p12 presenta homología de secuencia con varias proteínas capaces de interactuar con polisacáridos. Entre ellas, la que comparte mayor homología con p12 es la rhamnogalacturonasa (Xiang *et al.*, 2006), cuya estructura tridimensional esta fundamentalmente constituida por láminas beta.

A continuación y de forma no caracterizada hasta el momento, se produce la apertura del conector (formado por doce copias de proteína p10 dispuestas en forma de anillo; Guasch *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2000; Guasch *et al.*, 2002) situado en la base de la cápsida, posibilitándose la liberación del DNA viral y la digestión del peptidoglicano gracias a la actividad hidrolítica de la proteína terminal (Moak y Molineux, 2004), covalentemente unida al extremo derecho del genoma viral; aunque no se descarta que también exista proteína terminal libre en el interior de la cola del virión (Moak y Molineux, 2004; Xiang *et al.*, 2006), capaz de intervenir en la degradación de la pared. La polaridad de penetración del genoma es desde el extremo derecho hacia el extremo izquierdo (González-Huici *et al.*, 2004b), y los mecanismos por los cuales el DNA viral es capaz de atravesar la membrana celular son desconocidos.

El proceso de inyección completo del DNA de $\Phi 29$ ocurre en dos etapas (mecanismo de "*push-pull*", Figura 3; González-Huici *et al.*, 2004b): la internalización del extremo derecho parece ocurrir de forma espontánea gracias a la energía acumulada en el DNA, altamente empaquetado en el interior de la cápsida (Smith *et al.*, 2001). De esta forma se estima que aproximadamente el 65% del genoma es capaz de penetrar en el interior celular (etapa de "*push*"). La internalización del extremo izquierdo ocurre en una segunda etapa en la que se requiere la expresión de los genes localizados en el operón temprano derecho, dirigida por el promotor C2 y llevada a cabo por la RNA polimerasa bacteriana. Hasta el momento se ha podido identificar al menos una proteína codificada por este operón, la proteína p17, que juega un papel fundamental en esta segunda etapa, supuestamente formando parte de una maquinaria responsable de la entrada del resto del DNA genómico (etapa de "*pull*"), en la que no se descarta la presencia de proteínas celulares (González-Huici *et al.*, 2004b) y que estaría energizada por PMF (González-Huici *et al.*, 2006); lo que, en la mayoría de los casos estudiados, se ha asociado con la apertura de un poro/canal en la membrana que posibilitaría la internalización del genoma viral (Dreiseikermann, 1994; Letellier *et al.*, 1999). Una vez internalizado de manera completa el genoma de $\Phi 29$, se produciría la expresión del operón situado en el extremo izquierdo y de esta forma quedarían sintetizados todos los componentes necesarios para la replicación del DNA viral.

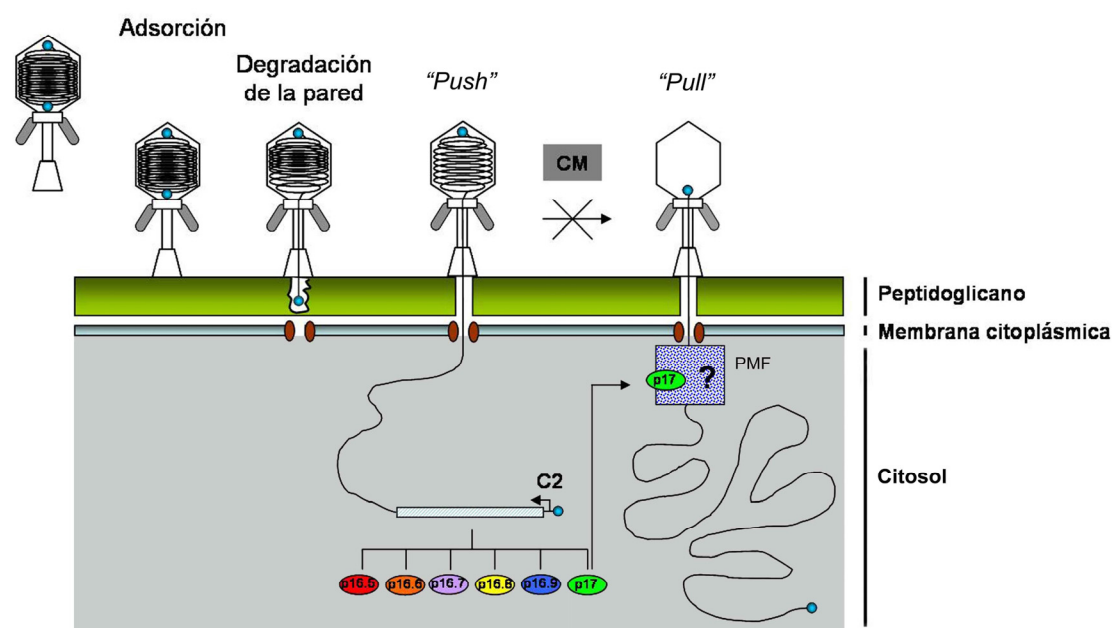


Figura 3: Modelo del mecanismo bifásico de “push-pull” de la inyección del DNA de $\Phi 29$ (González-Huici *et al.*, 2004b). Etapa de “push”: una vez que el fago se ha adsorbido (izquierda), la apertura del conector permite la liberación de ~65% del genoma viral al interior del citoplasma, gracias a la energía acumulada en el DNA empaquetado en el interior de la cápsida viral (Smith *et al.*, 2001). Previamente ha de producirse la degradación del peptidoglicano por parte de la proteína terminal (Moak y Molineux, 2004). El paso del DNA a través de la membrana podría posibilitarse gracias a la intervención de un canal de membrana no identificado hasta el momento (elipsoides marrones). Etapa de “pull”: a continuación, se produce la expresión de al menos cuatro proteínas (p16.7, p16.8, p16.9 y p17) del operón temprano (rectángulo azul claro) situado en el extremo genómico derecho dirigida por el promotor C2. La proteína p17 es esencial para la internalización eficiente del resto del DNA genómico y podría formar parte de un hipotético motor (cuadrado punteado) que estaría energizado por fuerza protón motriz (PMF) (González-Huici *et al.*, 2006), y donde no se descarta la presencia de componentes celulares desconocidos (?) hasta el momento. La adición de cloramfenicol (CM) inhibe la síntesis de proteínas virales impidiendo, por tanto, el desencadenamiento de la segunda etapa del proceso de inyección.

2.3 Mecanismo de replicación del DNA de $\Phi 29$

Para la replicación del DNA de $\Phi 29$ *in vivo* son absolutamente esenciales los productos de los genes 2, 3, 5 y 6 (Carrascosa *et al.*, 1976), que codifican, respectivamente, la DNA polimerasa (p2), la proteína terminal (p3 o TP), la SSB (p5, proteína de unión a DNA de cadena sencilla) y la DBP (p6, proteína de unión a DNA de cadena doble) (revisado en Salas, 1991; y en Salas *et al.*, 1996). La replicación del DNA de $\Phi 29$ sigue un mecanismo primado por proteína terminal (TP) y se esquematiza en la Figura 4, donde se representan ambos extremos del genoma viral. La iniciación de la replicación requiere la formación de un complejo nucleoproteico con la proteína p6 (Serrano *et al.*, 1989), cuya estructura, de filamento helicoidal dextrógiro

(Serrano *et al.*, 1990), es similar a la recientemente encontrada en DnaA (Erzberger *et al.*, 2006). Este complejo activa *in vitro* la iniciación (Pastrana *et al.*, 1985), así como la transición a la elongación (Blanco *et al.*, 1988). El heterodímero formado entre la DNA polimerasa y la TP cebadora (polimerasa/TP) reconoce los orígenes de replicación situados en los extremos del genoma (Blanco *et al.*, 1987). La DNA polimerasa produce la desoxinucleotidililación de la TP (Blanco y Salas, 1984) de tal forma que el segundo nucleótido de cada extremo, y no el terminal, es utilizado como molde dirigiendo la formación del complejo de iniciación, TP-dAMP. A continuación, el dAMP es apareado con el nucleótido terminal del molde, en un proceso denominado “*sliding-back*”, que permite asegurar una replicación completa (Méndez *et al.*, 1992). El complejo polimerasa/TP se disgrega tras la síntesis de un producto elongado de nueve nucleótidos, lo que da paso a la fase de elongación (Méndez *et al.*, 1997). La DNA polimerasa de $\Phi 29$ es altamente procesiva, estando la replicación del DNA acoplada al desplazamiento de banda, sin necesidad de helicasas ni factores auxiliares de procesividad (Blanco *et al.*, 1989), del tipo pinza deslizante (revisado en Kuriyan y O'Donnell, 1993). La SSB estabiliza la cadena desplazada, a la cual se une *in vitro* (Gutiérrez *et al.*, 1991). Este mecanismo de replicación genera dos tipos de intermedios, los de tipo I, con dos horquillas de replicación avanzando en direcciones opuestas y que al encontrarse generan dos intermediarios replicativos de tipo II (Figura 4), cada uno de ellos con una de las hebras paternas parcialmente replicada. Al terminar la replicación, la DNA polimerasa se disocia, quedando disponible para el siguiente ciclo replicativo (revisado en Salas *et al.*, 1996; y en Salas, 1999).

En la replicación del DNA de $\Phi 29$ están además implicadas otras proteínas virales como p1, una proteína asociada a membrana capaz de polimerizar *in vitro* (Bravo y Salas, 1998) y presumiblemente relacionada con el ensamblaje del aparato de replicación (Bravo y Salas, 1997; Bravo *et al.*, 2000). También está implicada la proteína viral p16.7, que ha sido involucrada en la redistribución de los sitios de replicación del DNA de $\Phi 29$ dentro de la célula infectada (Meijer *et al.*, 2000) y recientemente, se ha podido atribuir a esta proteína un papel en la organización y el anclaje del genoma viral a la cara interna de la membrana citoplasmática de la célula (Albert *et al.*, 2005).

Hasta el momento no se ha descrito la necesidad de ninguna proteína bacteriana para la replicación del genoma vírico, como por ejemplo sucede en adenovirus, donde la DNA polimerasa asociada con la proteína preterminal (equivalente a la TP de $\Phi 29$) necesita los factores de transcripción NFI y Oct-1 para estabilizarse en el origen de replicación (revisado en de Jong y van der Vliet, 1999)

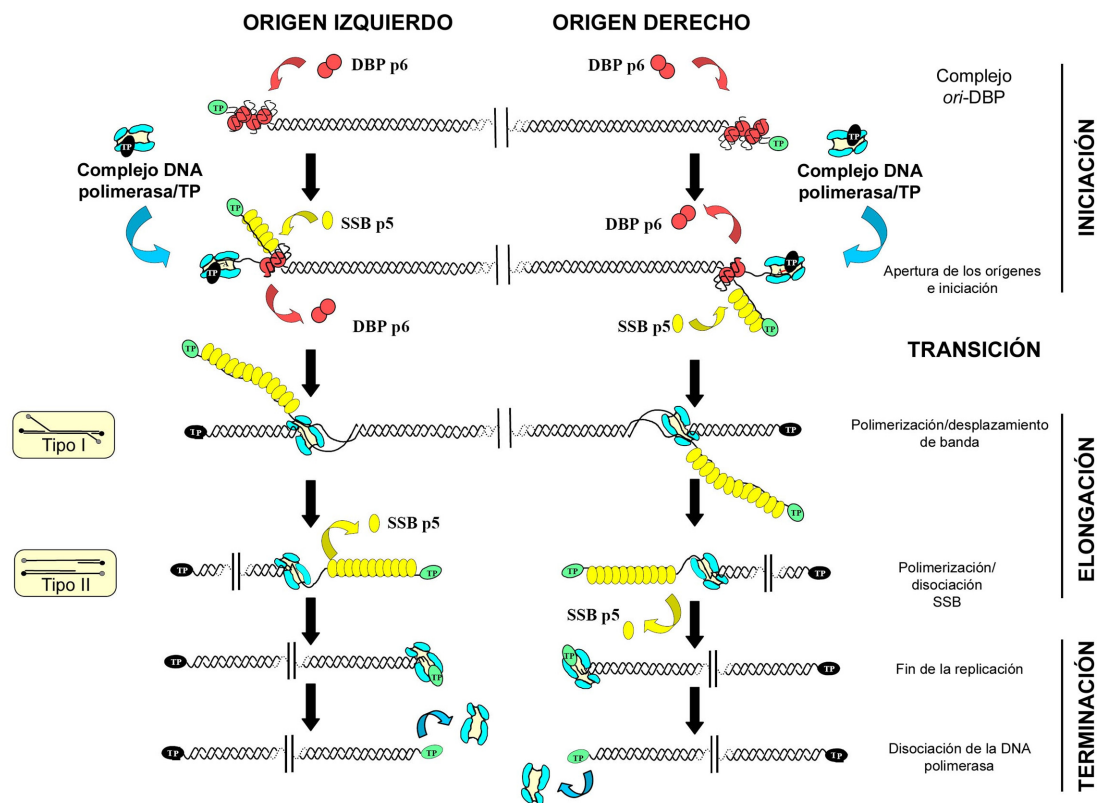


Figura 4: Mecanismo de replicación del DNA de $\Phi 29$. En la fase de iniciación se muestra la TP parental en verde y el complejo DNA polimerasa (azul)/TP cebadora (negro), la proteína p6 (DBP, en magenta) forma un complejo en los orígenes de replicación (*ori*), y la p5 (SSB, amarillo) estabiliza la cadena desplazada. La estructura de los dos intermediarios replicativos se indica a la izquierda.

2.4 El bacteriófago $\Phi 29$ y fagos relacionados.

Los fagos relacionados con $\Phi 29$ contienen, al igual que $\Phi 29$, un genoma lineal de dsDNA con una molécula de proteína terminal (TP) covalentemente unida a cada extremo 5' (revisado en Salas, 1991; Salas *et al.*, 1996; Salas, 1999). Constituyen un género de fagos líticos pertenecientes al orden *Caudovirales* (fagos con cola) y, dentro de éste, a la familia *Podoviridae*, que comprende fagos con cola corta (revisado en Ackermann, 1998). Infeccionan

el género *Bacillus*, integrado por numerosas especies de bacterias gram-positivas, aeróbicas y con capacidad de formar esporas, que normalmente habitan en el suelo o sobre materia vegetal en descomposición. Los fagos relacionados con $\Phi 29$ se subclasifican en tres grupos en base a sus propiedades serológicas, mapas físicos de DNA, mapas peptídicos (Yoshikawa *et al.*, 1985; Yoshikawa *et al.*, 1986) y comparación de sus secuencias de DNA (Pečenková y Pačes, 1999). El primer grupo incluye a los fagos $\Phi 29$, PZA, $\Phi 15$ y BS32, el segundo grupo incluye a los fagos Nf, B103 y M2Y; y el tercer grupo contiene al fago GA-1 como único integrante. La clasificación de estos fagos coincide con su lugar de aislamiento geográfico. Así, los fagos pertenecientes al grupo I fueron aislados en USA (Reilly, 1965), los del grupo II en Japón (Shimizu *et al.*, 1970; Grunow *et al.*, 1981; Ikeda *et al.*, 2004), y GA-1, único constituyente del grupo III, en Europa (Bradley, 1965). La mayoría de estos fagos infectan a *B. subtilis*, pero a menudo también pueden infectar a otras especies como *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*. De esta forma, $\Phi 29$ infecta, además de las estirpes de *B. subtilis* 168, 110NA y Marburg, a *B. amyloliquefaciens* H y a varias cepas de *B. pumilus* y *B. licheniformis* (Meijer *et al.*, 2001a). Por el contrario, GA-1 infecta y lisa a la estirpe de *Bacillus* sp. G1R (Arwert y Venema, 1974), mientras que es incapaz de infectar a otras estirpes del género *Bacillus*, como *B. subtilis* 168, *B. pumilus* BP1 o B205-L (Horcajadas, 2000).

3. LA PROTEINA p6 Y LA ORGANIZACIÓN DEL CROMOSOMA DE $\Phi 29$

3.1 La proteína p6 y su papel en la replicación y transcripción del DNA de $\Phi 29$

El producto del gen 6 del bacteriófago $\Phi 29$ es una proteína de 103 aminoácidos (Murray y Rabinowitz, 1982; Yoshikawa y Ito, 1982), que forma dímeros en solución (Pastrana *et al.*, 1985; Abril *et al.*, 1997), con afinidad por DNA de banda doble (Prieto *et al.*, 1988) con el que forma un nucleocomplejo multimérico cuya estructura se describe con más detalle en el siguiente apartado. La cantidad de proteína p6 en la célula infectada llega a alcanzar las 660000 moléculas (estimándose una concentración intracelular de 1.1 mM, sin

tener en cuenta la aglomeración macromolecular), cantidad 1.4 veces superior a la necesaria para cubrir la totalidad del DNA viral sintetizado en la infección (Abril *et al.*, 1997). Estudios de microscopía electrónica del DNA de $\Phi 29$ entrecruzado con psoraleno o glutaraldehído *in vitro*, han mostrado que la p6 se une a lo largo de todo el cromosoma, compactándolo (Gutiérrez *et al.*, 1994). Estos datos están de acuerdo con la hipótesis de que la p6 compacta y organiza el cromosoma de $\Phi 29$ (revisado en Serrano *et al.*, 1994), actuando a modo de proteína *histone-like*.

El producto del gen 6 es esencial para la replicación del DNA vírico *in vivo* (Carrascosa *et al.*, 1976; Bravo *et al.*, 1994; Camacho y Salas, 2000). *In vitro* se ha demostrado que estimula la formación del complejo de iniciación (Pastrana *et al.*, 1985), al disminuir 5 veces el valor de la K_m para la incorporación del dATP (Blanco *et al.*, 1986), así como la adición de los primeros nucleótidos a dicho complejo (Blanco *et al.*, 1988), fenómeno asociado a su capacidad de formar complejos nucleoproteicos en los orígenes de replicación (Otero y Salas, 1989; Freire *et al.*, 1994).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han atribuido también a la proteína p6 un importante papel en la regulación de la transcripción. La unión de la proteína p6 a los promotores tempranos C1 y C2 provoca su represión (Whiteley *et al.*, 1986; Barthelemy *et al.*, 1989; Camacho y Salas, 2000). Asimismo, la proteína p6, en coordinación con la proteína p4, interviene en el cambio de la transcripción temprana a la tardía (Camacho y Salas, 2001). *In vitro* la p6 es capaz de unirse débilmente a la región de los promotores A2c, A2b y A3. La proteína p6 aumenta la afinidad de p4 por su sitio de unión en el promotor A3, activando la transcripción tardía y reprimiendo la temprana desde el promotor A2b. Además, la unión de p4 estimula a su vez la unión de p6 al promotor temprano A2c, reprimiéndolo (Elías-Arnanz y Salas, 1999; Camacho y Salas, 2001).

3.2 Estructura del complejo proteína p6-DNA

El complejo multimérico de la proteína p6 con el DNA se detectó mediante *footprints* con DNasa I de fragmentos terminales de DNA de $\Phi 29$, que mostraron un patrón regular de protección con fuertes hipersensibilidades

cada 24 pb (Prieto *et al.*, 1988); el *footprint* con radical hidroxilo reveló protecciones de 3-4 pb por cada 12 pb (Serrano *et al.*, 1989). Este patrón constituye la repetición de un motivo formado por la interacción de un dímero de p6 cada 24 pb. Las hipersensibilidades a DNasa I sugieren que el DNA se encuentra curvado. Para entender la naturaleza de la estructura del complejo p6-DNA, es necesario tener en cuenta que la molécula de DNA presenta una estructura helicoidal periódica, donde el elemento estructural que se repite (vuelta de hélice) se denomina “repetición helicoidal absoluta”, H_c (ver Figura 5), que en un DNA en solución tiene un valor medio de 10.5 pb.

En la Figura 5 se representa un complejo multimérico DNA-proteína (en nuestro caso sería p6) donde se muestran con rectángulos rojos los contactos de la proteína con las cadenas azúcar-fosfato, y con rombos verdes los centros de los contactos.

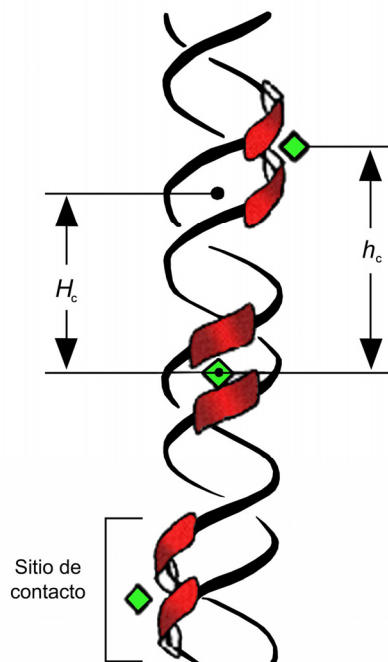


Figura 5: Repetición helicoidal absoluta (H_c) y repetición helicoidal de superficie (h_c) en un complejo multiproteico-DNA. Figura adapta de Serrano *et al.*, 1993b.

Los contactos de la proteína con el DNA pueden determinarse fácilmente mediante *footprint* con radical hidroxilo. Si el complejo DNA-proteína presenta una estructura regular, periódica, a la periodicidad de los centros de contacto se la denomina “repetición helicoidal de superficie”, h_c (ver Figura 5). Así, si un DNA está en contacto con una superficie plana, $H_c = h_c$ (ver Figura 6).

Si el DNA está enrollado alrededor de un oligómero de proteína $H_c \neq h_c$. El DNA adopta entonces una estructura superhelicoidal dextrógira si $h_c > H_c$ o levógira si $h_c < H_c$ (ver Figura 6).

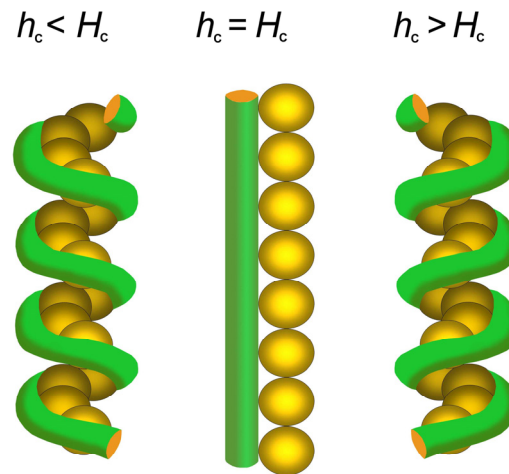


Figura 6: Estructuras adoptadas por una superhélice de DNA alrededor de un núcleo multiproteico. La proteína se representa mediante esferas amarillas, mientras que el DNA se representa en verde. Figura adapta de Serrano *et al.*, 1993b.

Para la proteína p6, dado que la periodicidad de las curvaturas o repetición helicoidal de superficie ($h_c=12$ pb) era mayor que la repetición helicoidal (H_c) del DNA (10.5 pb), se propuso un modelo en el cual el DNA está arrollado dextrógiramente alrededor de un núcleo de proteína p6 ($h_c > H_c$) (Serrano *et al.*, 1990). Según este modelo la proteína p6 mantendría supervueltas positivas en un DNA circular cerrado, como se demostró posteriormente (Serrano *et al.*, 1993a).

Por análisis de delección se localizaron sitios de unión preferente de la proteína p6 entre las posiciones 62 y 125 del extremo derecho y 46 y 68 del extremo izquierdo del DNA de $\Phi 29$; pero no se encontró ni siquiera una débil homología de secuencia entre ambas regiones, por lo que se propuso que la proteína reconocería más bien una característica estructural del DNA, tal como la tendencia a curvarse cada 12 pares de bases; de hecho, se encontraron secuencias que favorecerían la formación del complejo en las regiones de nucleación descritas (Serrano *et al.*, 1989) aplicando algoritmos de predicción de curvabilidad (Satchwell *et al.*, 1986). Para comprobar esta hipótesis se construyeron concatémeros formados por repeticiones en tándem de 24 pb (sitio de unión de un dímero de p6) de una de estas secuencias. La proteína p6

se unió a estos concatémeros con mayor afinidad que al fragmento terminal correspondiente del DNA de $\Phi 29$ (Serrano *et al.*, 1993a).

La construcción de plásmidos conteniendo distinto número de sitios de unión de dímeros de p6 permitió medir el incremento del número de enlace (ΔL_k) producido por la unión de un dímero de p6, determinándose un ΔL_k de +0.1/dímero. Este dato, junto con el de la compactación producida por p6 (4.2 veces), medida por microscopía electrónica de complejos entrecruzados, y el de la repetición helicoidal de superficie (h_c) (ver Figura 5) del DNA en el complejo (12 pb), permitió determinar los parámetros de la superhélice de DNA en complejo con p6 (Serrano *et al.*, 1993a). Según esto, cada supervuelta está formada por 63 pb (2.6 dímeros de p6), con un diámetro de 6.6 nm y una inclinación de 14° . El modelo de complejo p6-DNA propuesto se muestra en la Figura 7.

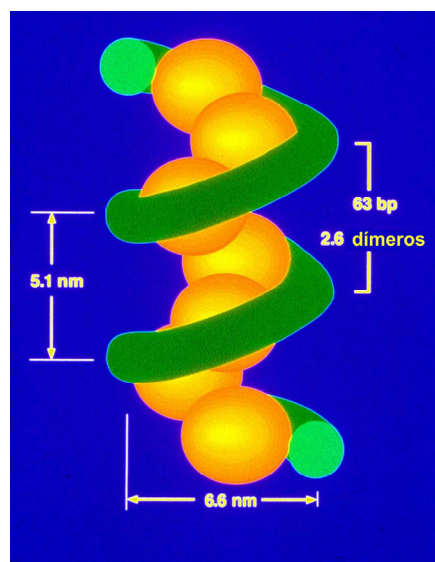


Figura 7: Modelo del complejo proteína p6-DNA. Las esferas amarillas representan dímeros de proteína, mientras que la espiral verde representa a la doble hélice del DNA. Figura adaptada de Serrano *et al.*, 1993a.

La estructura secundaria de la región N-terminal de la proteína p6 se ha predicho como una α -hélice anfipática (Freire *et al.*, 1994) donde los residuos cargados positivamente de esta hélice putativa, Lys2 y Arg6, están involucrados en la interacción con el DNA *in vitro* (Freire *et al.*, 1994).

La autoasociación de la proteína p6 de $\Phi 29$ ha sido estudiada mediante ultracentrifugación analítica, determinándose que en ausencia de DNA y en un rango de concentración entre 1 y 100 μM , la proteína se encuentra en un equilibrio monómero-dímero con una constante de asociación de $\sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Sin embargo, cuando la concentración alcanza valores alrededor de 1 mM,

cifra que se corresponde con la concentración mínima estimada de p6 en células infectadas, la proteína pasa a formar oligómeros (el valor de la constante de oligomerización es de $\sim 3.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) (Abril *et al.*, 1997). Mediante microscopía electrónica y procesamiento de imágenes, se han podido identificar estructuras anulares compatibles con estructuras helicoidales dextrógiras de dimensiones análogas (Abril *et al.*, 1999) a las determinadas para el DNA en el complejo (Serrano *et al.*, 1993a). Esto sugiere que el oligómero de p6 podría tener una estructura que serviría de guía para la adecuada conformación del DNA viral en el complejo con p6 (Abril *et al.*, 1999).

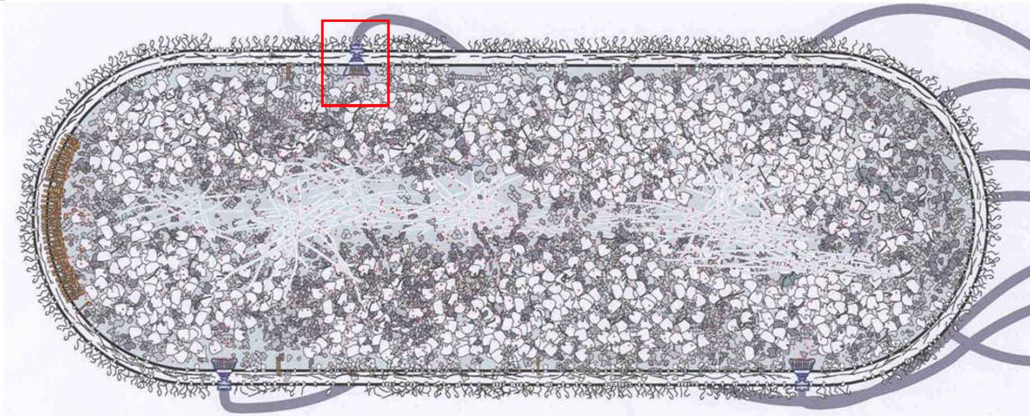
Recientemente, se ha determinado por difracción de rayos-X la estructura de oligómeros de DnaA, la proteína iniciadora de la replicación en procarióticos, presentando una estructura helicoidal dextrógira (Erzberger *et al.*, 2006), que podría tener semejanzas con la estructura del oligómero formado por p6. Esta estructura es similar a la obtenida por microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de ORC de *Drosophila melanogaster* (Clarey *et al.*, 2006), por lo que se ha propuesto que tanto en bacterias como en eucariotas, el DNA se enrolla alrededor de filamentos proteicos para abrir la doble hélice y ensamblar la maquinaria replicativa (O'Donnell y Jeruzalmi, 2006).

4. INTERACCIONES MACROMOLECULARES EN MEDIOS AGLOMERADOS

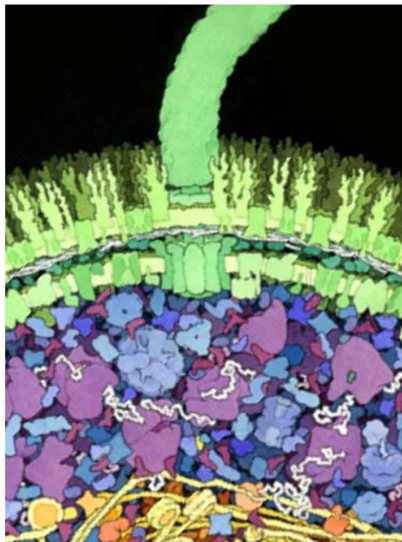
La gran mayoría de los procesos bioquímicos, como las interacciones proteína-proteína o proteína-DNA, son realizados por macromoléculas organizadas en complejos, que interaccionan de manera reversible para formar las estructuras funcionalmente activas (revisado en Alberts, 1998). Estas reacciones y procesos de asociación tienen lugar *in vivo* en ambientes muy aglomerados (Figura 8A y B), caracterizados por una alta fracción de volumen ocupado por macromoléculas. Así, el citoplasma celular contiene concentraciones totales de macromoléculas de entre 50 y 400 gramos/litro (Fulton, 1982; Zimmerman y Trach, 1991). Estos medios aglomerados son muy diferentes de las disoluciones diluidas (con concentraciones $< 1 \text{ mg/ml}$) en las que los complejos macromoleculares se estudian normalmente *in vitro* (Figura

8C). En una disolución en la que las macromoléculas ocupan una fracción significativa del volumen total (disolución “aglomerada”), existe una importante exclusión del volumen accesible a una macromolécula: debido a que dos moléculas no pueden ocupar la misma región del espacio, cuando la concentración de macromoléculas es muy alta, una proporción significativa de volumen está físicamente ocupada y, por tanto, no disponible para otras moléculas.

A



B



C

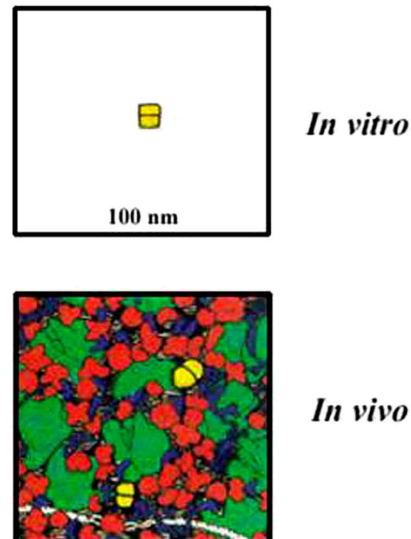


Figura 8: Aglomeración macromolecular en los compartimentos celulares. **A:** Representación del interior de una célula procariótica de *E. coli*. El citoplasma presenta una estructura de gel y/o matriz sólida altamente organizada funcional y estructuralmente, donde las macromoléculas están densamente aglomeradas y como consecuencia de ello, la difusión de complejos macromoleculares está muy dificultada. **B:** Ampliación de la región enmarcada en rojo en A. **C:** Comparación del entorno de una macromolécula en un experimento *in vitro* realizado en solución diluida, con la situación encontrada *in vivo*. En amarillo se representa la molécula (p.e. una proteína) en tampón (*in vitro*) y en el interior del mismo volumen de citoplasma bacteriano, donde dicha proteína ejerce su función (Figuras adaptadas de Ellis y Hartl, 1996; Ellis, 2001).

En estas condiciones, las macromoléculas ven reducida su entropía traslacional y rotacional, lo que provoca que la energía libre de la solución y el potencial químico de los componentes sean mayores. Una de las maneras en que el sistema puede reducir su energía libre es maximizando su volumen accesible o minimizando el volumen excluido (ver Figura 9), por lo que un efecto fundamental de la aglomeración macromolecular es que favorece los procesos que conducen a una reducción en el volumen excluido, como son las reacciones de compactación y asociación (revisado en Zimmerman y Minton, 1993; Rivas *et al.*, 1999a; Minton, 2000b; Ellis, 2001; Minton, 2001).

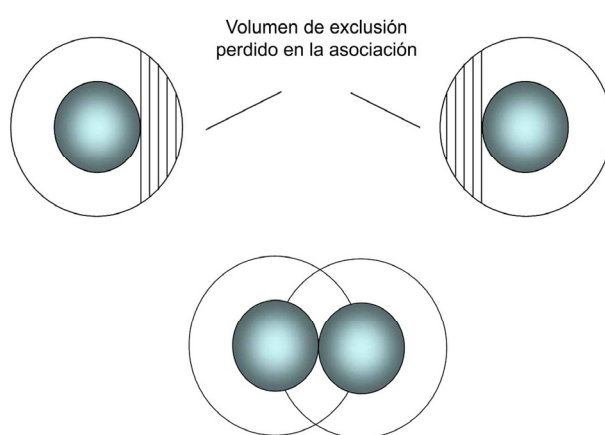


Figura 9: Representación de la pérdida del volumen excluido en un evento de asociación. Se han representado dos moléculas esféricas idénticas, donde la posición de cada una queda perfectamente definida por la posición de su centro. En principio, lo más cercanos que pueden estar dos centros, es una distancia igual a la suma de los radios de las dos partículas, de modo que alrededor de cada molécula hay un volumen en el cual los centros de otras moléculas están excluidos. La formación de un dímero de proteína a partir de dos monómeros esféricos genera una pérdida de volumen excluido a un soluto inerte, representado por las regiones rayadas. Figura adaptada de Ralston, 1990.

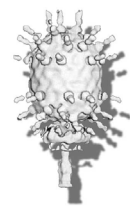
Una de las consecuencias que se desprenden del fenómeno de exclusión de volumen, es que las macromoléculas más grandes y elongadas verán más potenciada su capacidad asociativa por la aglomeración macromolecular que las macromoléculas más pequeñas y compactas. Esta es la razón por la que uno de los efectos más pronunciados de la exclusión de volumen, es el incremento de la velocidad y grado de formación de grandes complejos macromoleculares, como polímeros de proteínas (Minton, 2000b) o como es el caso del complejo formado por la proteína p6 del bacteriófago $\Phi 29$ con el DNA viral.

Las consecuencias termodinámicas y cinéticas que sobre la formación de estos complejos tiene el hecho de que el volumen accesible sea sustancialmente menor que el total, pueden modificar cualitativa y cuantitativamente gran parte de las conclusiones derivadas de los estudios realizados *in vitro* (revisado en Rivas *et al.*, 2004). Es decir, la aglomeración macromolecular puede afectar considerablemente a un gran número de procesos bioquímicos, biofísicos y fisiológicos que incluyen, entre otros, el equilibrio y la cinética de asociación proteína-proteína así como las interacciones proteína-DNA (revisado en Zimmerman y Minton, 1993; Minton, 2000b; Ellis, 2001; Minton, 2001; Rivas *et al.*, 2001). En general, la aglomeración macromolecular proporciona una fuerza no específica para la compactación y la asociación de macromoléculas (revisado en Minton, 1981; Zimmerman y Minton, 1993; Minton, 1998). Para estudiar estos efectos, es posible mimetizar *in vitro* el entorno celular aglomerado mediante la adición de concentraciones elevadas de polímeros inertes (dextrano, Ficoll) o macromoléculas naturales (ovoalbúmina), denominados “agentes de aglomeración”. Como ejemplo de la relevancia de estos estudios, existen trabajos que han demostrado que la aglomeración macromolecular en el citoplasma de las neuronas puede favorecer y acelerar la formación y estabilización de protofibrillas de α -sinucleína (Uversky *et al.*, 2001; Shtilerman *et al.*, 2002), directamente relacionadas con la enfermedad neurodegenerativa de Parkinson. Estas fibras aparecen con el envejecimiento, lo que podría ser una consecuencia directa del aumento de la concentración total de proteína intracelular con la edad. Esta hipótesis está apoyada por la evidencia de una disminución significativa del contenido de agua en el cerebro con el envejecimiento (Naber *et al.*, 1979; Nagy *et al.*, 1981; Nagy *et al.*, 1982). En *E. coli*, se ha comprobado que la aglomeración macromolecular es un factor importante en los mecanismos de compensación que actúan al producirse grandes cambios en la osmolaridad del medio (revisado en Record *et al.*, 1998). Estos mecanismos están implicados en la regulación de interacciones macromoleculares esenciales, que permiten que *E. coli* sea capaz de adaptarse a amplios cambios en la osmolaridad del entorno, mediante la modificación de la cantidad de agua citoplásmica y osmolitos cargados. Los cambios en la cantidad de agua citoplásmica provocan grandes cambios en la

concentración iónica intracelular que deberían afectar enormemente a las interacciones no covalentes proteína-proteína y proteína-DNA. Sin embargo, estas interacciones han resultado ser *in vivo* relativamente independientes de la concentración iónica intracelular (Richey *et al.*, 1987). Se ha podido comprobar que cuando las células crecen en un medio donde la osmolaridad es elevada, disminuye la cantidad de agua libre citoplásmica, produciéndose un incremento en las concentraciones intracelulares de osmolitos cargados (revisado en Record *et al.*, 1998). Este fenómeno provocaría un incremento en las concentraciones de los polímeros citoplásmicos solubles, que incrementaría en órdenes de magnitud su actividad termodinámica, debido al efecto de la aglomeración macromolecular, a su vez provocado por la disminución de la cantidad de agua libre citoplásmica. Así, la aglomeración macromolecular sería responsable del incremento experimentado en las actividades termodinámicas, lo que podría estimular enormemente la unión de las proteínas que interaccionan con el DNA, compensando el efecto desestabilizador que el aumento de la concentración intracelular de osmolitos cargados ejercería sobre las interacciones DNA-proteína.

Por todo lo comentado anteriormente, la simulación de entornos aglomerados en reacciones *in vitro* aporta información relevante sobre las características de los procesos de asociación y ensamblaje en un entorno más similar al fisiológico. Estas razones han llevado a analizar el efecto de la aglomeración macromolecular en la interacción proteína p6-DNA.

Objetivos



El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio *in vivo* e *in vitro* de la interacción de la proteína p6 del bacteriófago $\Phi 29$ con el DNA y la determinación de las principales variables involucradas en la interacción, así como el estudio comparativo con la unión al DNA *in vivo* de la proteína p6 del fago GA-1. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

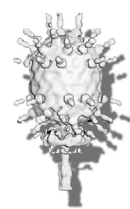
1. Analizar la unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ al DNA *in vivo* e *in vitro* determinando el efecto del superenrollamiento, la secuencia nucleotídica y la curvabilidad de la secuencia, así como el posible efecto de proteínas virales, en la modulación de la interacción p6-DNA.

2. Analizar la unión de la proteína p6 de GA-1 al DNA *in vivo* y el efecto del superenrollamiento en la interacción. Estudiar la unión al DNA y la capacidad de trans-complementación en el sistema heterólogo utilizando un mutante $\Phi 29$ *sus6*.

3. Profundizar en la caracterización del proceso de inyección del DNA de $\Phi 29$ utilizando como herramienta la heteroasociación p6-DNA.

4. Caracterizar la interacción de la proteína p6 con el DNA mediante ultracentrifugación analítica, en términos de un esquema termodinámico de asociación (estequiometría, cooperatividad y constante de afinidad de la interacción) y obtener información hidrodinámica del nucleocomplejo. Describir el efecto de la aglomeración macromolecular en la interacción p6-DNA.

Materiales y Métodos



MATERIALES

1. Plásmidos, estirpes bacterianas y bacteriófagos

Se han utilizado los plásmidos pPR55w6 y pPR55ow6 que tienen clonado, bajo el control del promotor P_R de λ , el gen 6 de $\Phi 29$ en la misma orientación y en sentido inverso respecto al promotor P_R , respectivamente (Bravo *et al.*, 1994); así como el plásmido pPR54 (Serrano-Heras *et al.*, 2005), todos derivados del plásmido pUB110 de *Staphylococcus aureus* (McKenzie *et al.*, 1986). También se han utilizado los plásmidos pRP8, derivado del plásmido pBR322 con el gen 6 de $\Phi 29$ bajo el control del promotor P_L de λ (Pastrana *et al.*, 1985), pACYC184 (New England Biolabs), pUC19 (New England Biolabs), pT7-4 (Tabor y Richardson, 1985), p(24)₁₂ (Serrano *et al.*, 1993a), pR259 y pL259 (González-Huici *et al.*, 2000).

Las cepas de *E. coli* utilizadas han sido DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* ($\Phi 80$ *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*] (Hanahan, 1983), BL21 (DE3) [*hsdS* *gal* (λ *clts857* *ind1* *Sam7* *nin5* *lacUV5-T7* gen 1)] (Studier y Moffatt, 1986), NF-1 [λ lisógeno κ -12 Δ *trp*(λ N κ /857 Δ H1) (κ -12 Δ H1 Δ *trp*)] con el represor termosensible *cl857* de λ (Remaut *et al.*, 1981), y XL-1 Blue [*endA1* *gyrA96*(*nal*^R) *thi-1* *recA1* *relA1* *lac* *glnV44* F'[::Tn10 *proAB*⁺ *lacI*^R Δ (*lacZ*)M15] *hsdR17*(*r*_K⁻ *m*_K⁺)] (Bullock y Fernández, 1987).

Las cepas de *Bacillus* empleadas han sido *B. subtilis* 110NA (*trpC2*, *spo0A3*, *su*⁻) (Moreno *et al.*, 1974), *B. subtilis* YB886 (Rottländer y Trautner, 1970; Yasbin *et al.*, 1980) y *Bacillus* sp. G1R (Arwert y Venema, 1974).

Se han utilizado los bacteriófagos de *B. subtilis* $\Phi 29$ *sus14*(1242) (Jiménez *et al.*, 1977), mutante de lisis retardada que no sintetiza holina pero de fenotipo salvaje para el resto de los procesos; $\Phi 29$ *sus1*(629), $\Phi 29$ *sus6*(626) (Reilly *et al.*, 1973), $\Phi 29$ *sus3*(91), $\Phi 29$ *sus17*(112) (Moreno *et al.*, 1974) y $\Phi 29$ *sus16.7*(48)/*sus14*(1242) (Meijer *et al.*, 2001b); este último será denominado simplemente como *sus16.7*(48). También se ha empleado el bacteriófago GA-1 salvaje, que infecta *Bacillus* sp. G1R (Arwert y Venema, 1974).

2. Reactivos y antibióticos

Todos los reactivos, enzimas y productos químicos que han sido utilizados y se exponen a continuación (apartados 2-6 de Materiales), fueron de un alto grado de pureza, adecuado para Biología Molecular. Así, el formaldehído (solución al 37%), el dextrano T-10 y la cloroquina se adquirieron de Sigma-Aldrich.

La fleomicina se obtuvo de Cayla S.A.R.L.; la ampicilina, el cloramfenicol, el ácido nalidíxico y la novobiocina de Sigma-Aldrich.

3. Cromatografía

Se usaron columnas de fosfocelulosa (P11) de Whatman, Heparina-agarosa de Sigma-Aldrich y Q-Sepharosa de Amersham Pharmacia Biotech.

4. Nucleótidos, oligonucleótidos y DNAs

Los desoxinucleótidos, incluyendo los marcados radiactivamente, se compraron a Amersham Pharmacia Biotech, y los oligodesoxinucleótidos de banda simple a Isogen y Sigma-Aldrich.

Los TP-DNAs de $\Phi 29$ y GA-1 fueron purificados por Laurentino Villar según está descrito (Peñalva y Salas, 1982). Los fragmentos de DNA de banda doble fueron obtenidos mediante síntesis por PCR o por digestión de plásmidos, según se indique en cada caso. Estos fragmentos de DNA se purificaron empleando el *Qia Quick Gel Extraction Kit* de Qiagen. Para la preparación de DNA plasmídico a pequeña escala se empleó el *Wizard Plus SV Minipreps* de Promega.

5. Proteínas

La proteinasa K se compró a Boehringer Mannheim, la proteína A-Sepharose CL-4B, la nucleasa de micrococo y la DNasa I a Amersham Pharmacia Biotech. Los enzimas de restricción, la DNA ligasa, la polinucleótido quinasa (PNK), el fragmento de Klenow y la Vent DNA polimerasa fueron de

New England Biolabs. La RNasa A, la lisozima y la seroalbúmina bovina (BSA) se adquirieron de Sigma-Aldrich. La fosfatasa alcalina (CIAP) y la topoisomerasa I se compraron a Promega. La proteína terminal (TP) y DNA polimerasa de GA-1 así como la proteína p6 de $\Phi 29$, fueron purificadas por José María Lázaro basándose en los protocolos descritos para la proteína terminal (Prieto *et al.*, 1984), la DNA polimerasa (Blanco y Salas, 1984) y la proteína p6 (Pastrana *et al.*, 1985).

6. Adyuvantes

Los adyuvantes completo e incompleto de Freud, empleados en la obtención de los anticuerpos dirigidos contra la proteína p6 de GA-1, se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

MÉTODOS

1. Condiciones de crecimiento

Las bacterias se crecieron en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) a 30°C (salvo que se indique lo contrario) hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml (D.O_{420nm}: 0.46) y, a continuación, se infectaron empleando una m.d.i.=3-10, según el caso. La fleomicina, la ampicilina y el cloramfenicol se utilizaron a concentraciones finales de 0.8, 100 y 34 µg/ml, respectivamente.

2. Interacción p6-DNA *in vivo*: entrecruzamiento con formaldehído e inmunoprecipitación (X-ChIP) de DNA asociado a la proteína p6

En la Figura 10 se muestra un esquema de la técnica de entrecruzamiento *in vivo* con formaldehído e inmunoprecipitación (X-ChIP) de secuencias de DNA específicas unidas a la proteína objeto de estudio. En el caso particular de esta tesis se trata de la proteína p6 de los bacteriófagos Φ29 y GA-1.

B. subtilis 110NA conteniendo el plásmido pPR55ow6 o pPR55w6 (ver apartado 1.1 de Materiales) se creció a 30°C en medio LB (suplementado con 5 mM MgSO₄ en todos los casos) hasta una D.O_{420nm}: 0.46 (correspondiente a una densidad de 10^8 células/ml de cultivo), infectándose con Φ29 *sus14*(1242) a una multiplicidad de 10, salvo que se indique lo contrario. El entrecruzamiento se realizó a los tiempos post-infección indicados. Las células de *E. coli* NF-1/pACYC184/pRP8 se crecieron de la misma manera en medio LB hasta D.O_{420nm}: 0.46, con la excepción de que se indujo a continuación la síntesis de la proteína p6 de Φ29 durante 15 minutos a 37°C antes de efectuar el entrecruzamiento, ya que su expresión está controlada por el represor termosensible cl857 de λ. Para los entrecruzamientos llevados a cabo con el bacteriófago GA-1 se infectó la estirpe *Bacillus* sp. G1R transformada con el plásmido pPR55ow6, realizando el entrecruzamiento a los tiempos post-infección indicados. En los entrecruzamientos con la proteína p6 de GA-1 en *B. subtilis* 110NA, se empleó la cepa productora de p6 de GA-1 conteniendo el plásmido pPR54+gen6(GA-1), denominada 110NA/p6GA1, que se creció en

medio LB hasta alcanzar una $D.O_{420nm}$: 0.46 y a continuación se indujo la síntesis de la proteína p6 de GA-1 durante 15 minutos a 40°C, ya que su expresión está controlada por el represor termosensible cl857 (ver apartado 5.4). En los entrecruzamientos con proteína p6 de $\Phi 29$ en *Bacillus* sp. G1R, se empleó esta estirpe transformada con el plásmido pPR55w6.

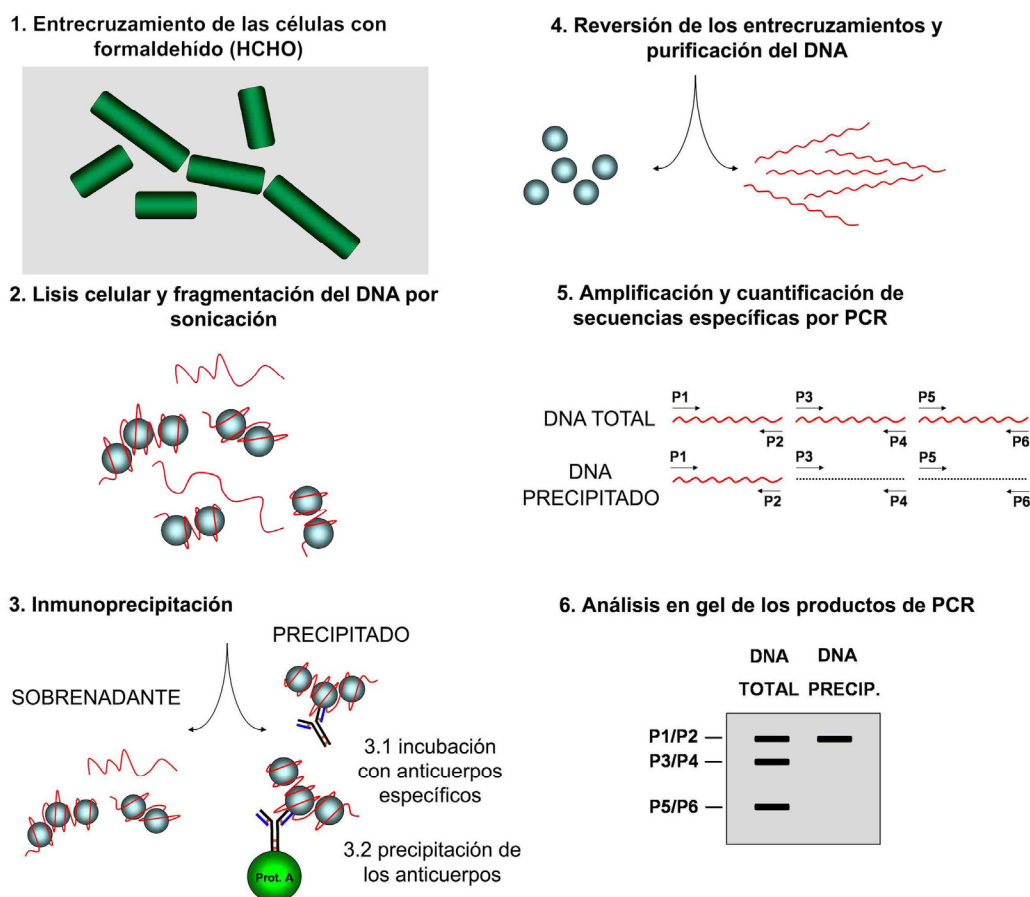


Figura 10: Identificación de las secuencias de DNA unido específicamente a una proteína. Esquema de la técnica de entrecruzamiento *in vivo* con formaldehído y análisis del DNA (rojo) específicamente coimmunoprecipitado con la proteína de interés (esferas azules). La proteína A-*Sepharose* se muestra en verde. P1-P2, P3-P4 y P5-P6 representan pares de oligonucleótidos ($\rightarrow\leftarrow$) para amplificar regiones específicas del DNA. Las líneas discontinuas negras (.....) representan fragmentos de DNA no inmunoprecipitados. En esta tesis, en vez de analizarse por electroforesis las secuencias amplificadas, se cuantificaron mediante PCR en tiempo real (paso n°6).

Para cada entrecruzamiento, se tomaron alícuotas de 20 ml de cultivo y se añadió formaldehído a una concentración final del 1% y 10 mM fosfato sódico pH 7.2, dejando el cultivo en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos. La fijación se paró añadiendo directamente al cultivo glicina hasta 125 mM. Se centrifugó cada alícuota a 10000xg lavándose el sedimento de bacterias 2 veces con tampón PBS (Ausubel *et al.*, 1990). La lisis se llevó a

cabo resuspendiendo las bacterias contenidas en 10 ml de cultivo en 500 μ l de tampón A (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA), que se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 3 mg/ml de lisozima. A continuación se añadieron 500 μ l de tampón IP 2X (Tris-HCl 100 mM, pH 7.0; NaCl 300 mM; Triton X-100 2%) y SDS hasta 0.1%, incubándose 10 minutos a 37°C. Acto seguido se añadió CaCl_2 hasta 13 mM y 0.005 unidades de nucleasa de micrococo. Después de incubar 10 minutos a 37°C, la digestión se detuvo añadiendo EDTA hasta 20 mM. Esta digestión suave permite el relajamiento del DNA plasmídico y evita que pueda haber diferencias en el tamaño de fragmentación por sonicación, debidas al superenrollamiento. El DNA se fragmentó hasta un tamaño medio de 750 pb por sonicación (3 pulsos de 10 segundos a 15 micrones). Los restos celulares insolubles se eliminaron mediante centrifugación a 20000xg durante 15 minutos. Se guardaron 100 μ l de la fracción soluble como control de DNA total (T) y el resto se incubó con agitación suave a 4°C durante 16 horas con 20 μ l de suero conteniendo anticuerpos policlonales anti-p6 (α p6) o, alternativamente, con un suero no inmune (pNi), como control de precipitación inespecífica. Se añadieron 120 μ l de una suspensión de proteína A-Sepharose al 25% y se prosiguió la incubación durante 2.5 horas más a 4°C. La resina sedimentada al centrifugar durante 20 segundos a 20000xg, se lavó 2 veces con tampón IP (1X)-0.1% SDS, 3 veces con tampón IP 1X y 2 veces con tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 1mM). Se resuspendió en 150 μ l de tampón TE con 1% SDS y se incubó durante 6 horas a 65°C para revertir los entrecruzamientos. A continuación se llevó la muestra hasta un volumen de 300 μ l con TE y se trató sucesivamente con RNasa A (50 μ g/ml) durante 10 minutos a 37°C y con proteinasa K (50 μ g/ml) durante 3 horas a 37°C. El DNA se extrajo con fenol y se precipitó con etanol. Las muestras de DNA total (T) se procesaron de la misma manera. El DNA inmunoprecipitado, equivalente a 9 ml de cultivo, se resuspendió en 90 μ l de H_2O (α p6 y pNi), y el DNA total (T), equivalente a 1 ml de cultivo, en 100 μ l, utilizándose las muestras obtenidas como molde para reacciones de PCR en tiempo real. Las PCRs se realizaron en un termociclador *Light Cycler* utilizando el kit comercial "*Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I*" hot-start reaction mix de Roche. Los datos obtenidos fueron interpolados sobre una recta estándar elaborada a partir de

cantidades conocidas de DNA purificado plasmídico o genómico viral. Los resultados fueron expresados como nanogramos de DNA (plasmídico o de $\Phi 29$) por mililitro de cultivo, salvo que se especifique lo contrario. La unión de la proteína p6 se expresó como coeficiente de inmunoprecipitación (IC); siendo $IC = [(\alpha p6 - pNi)/T] \times 10^6$ donde $\alpha p6$ representa el DNA inmunoprecipitado con anticuerpos específicos contra la proteína p6 y pNi representa el DNA inmunoprecipitado con suero no inmune (inmunoprecipitación inespecífica). El valor obtenido se divide entre la cantidad de DNA total de la muestra (T) y se multiplica, de forma arbitraria, por 10^6 .

Las amplificaciones en tiempo real se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l, con 1 μ M de cada uno de los oligonucleótidos (las coordenadas de cada uno de ellos se detallan en las Tablas 1 y 2). En todos los casos se comenzó con un paso de incubación de 10 minutos a 95°C para activar la DNA polimerasa Taq, seguido de 30 ciclos de amplificación, siendo el paso de desnaturalización de 15 segundos a 95°C para todas las reacciones. Los tiempos y las temperaturas de hibridación/elongación de las secuencias amplificadas del DNA de $\Phi 29$ y GA-1 (cuyas coordenadas se muestran en paréntesis), así como de los distintos DNAs plasmídicos fueron los siguientes:

-para el fago $\Phi 29$: fragmentos **L** (1-259) y **11.7** (11567-11778): 5 s a 53°C/15 s a 72°C; fragmento **5.1** (4895-5257): 10 s a 48°C/60 s a 72°C; fragmentos **7.4** (7255-7528) y **9.7** (9507-9820): 10 s a 51°C/30 s a 72°C; fragmento **R** (18988-19285): 5 s a 50°C/40 s a 72°C.

-para el fago GA-1: fragmentos **L** (1-300) y **R** (20817-21129): 10 s a 57°C/40 s a 72°C; fragmento **6.5** (6462-6823): 10 s a 59°C/40 s a 72°C; fragmentos **10.7** (10695-11001) y **16.5** (16302-16567): 10 s a 60°C/40 s a 72°C.

-para los plásmidos pPR55ow6 o pPR55w6: región **P1** (2578-2873): 10 s a 50°C/15 s a 72°C.

-para las células de *E. coli* NF-1: conteniendo los derivados del plásmido pACYC184, se amplificó las regiones **P1'** (cuyas coordenadas de posicionamiento son 1612-1711, sin considerar la longitud de los insertos): 10 s a 58°C/40 s a 72°C y **P2** (3607-3979): 10 s a 52°C/40 s a 72°C.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones del DNA del fago $\Phi 29$

Región	Coordenadas	Secuencia
L	U-1	AAAGTAAGCCCCCACCCTCACATG
	L-259	GCCCACATACTTTGTTGATTGG
5.1	U-4895	GATTTCTCTCTGCATCATTTTTTGC
	L-5257	CAAAATATCTTCGTGTTCTTCTGG
7.4	U-7255	GAAGTAGATGATATTAAGGACGCC
	L-7528	CTGACAGAAGACCAAGCACATCGG
9.7	U-9507	CTGACAACATCGGAAATTACAGCG
	L-9820	TTGTTGTAAACGTCTCTCTGACCC
11.7	U-11567	GGATTCTCAATGACGGGTTAGA
	L-11778	CACATACACAGGAAAACCAGACTC
R	U-18998	AAATAGATTTTCTTTCTTGGCTAC
	L-19285	AAAGTAGGGTACAGCGACAACATAC
P1	U-2578	GGGCAAAATCGCATCGTGGAACG
	L-2873	TCTTGGTCGTCAGACTGATGGGCC

Secuencia desde el extremo 5' de los oligonucleótidos usados para amplificar las regiones inmunoprecipitadas $\Phi 1$ - $\Phi 6$ de $\Phi 29$ y P1 del plásmido pPR55ow6 o pPR55w6. U indica "upper" y L "lower" para cada pareja de oligonucleótidos.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones del DNA del fago GA-1

Región	Coordenadas	Secuencia
L	U-1	AAATAGAGTCCACCCTTCCTCCCCT
	L-300	GGCGCAATGAGAAACACCACAGCT
6.5	U-6462	GCAAATTTAGCCGTTGTTGTTGGG
	L-6823	AGTTGTGCGTTGAACTCTTCTAAACTC
10.7	U-10695	TTCTGCTCCTACTTATCAAAAGTC
	L-11001	ATCTGTGTTAACTTTTTTACCTGC
16.5	U-16302	GCTACTGATTTAGAGCTACTTAAG
	L-16567	GGTATTTTAATAGTTTCTCCTGCG
R	U-20817	CATGACATGCGTCAAGATATATCC
	L-21129	AAATAGATTCCCCATGAACAAGCG
P1	U-2578	GGGCAAAATCGCATCGTGGAACG
	L-2873	TCTTGGTCGTCAGACTGATGGGCC

Secuencia desde el extremo 5' de los oligonucleótidos usados para amplificar las regiones inmunoprecipitadas GA1-GA5 del DNA del fago GA-1 y P1 del plásmido pPR55ow6 o pPR55w6. U indica "upper" y L "lower" para cada pareja de oligonucleótidos.

Para amplificar la región P1' del plásmido pACYC184, se emplearon los cebadores U-1612 y L-1711, de secuencia TCGGCACCGTCACCCTGG y TGACTGGCGATGCTGTCGGA, respectivamente. Para amplificar la región P2 se emplearon los cebadores U-3607 y L-3979, de secuencia AAGCACACGGTCACACTG y TATGGACAACCTTCTTCGC, respectivamente. U indica “upper” y L “lower” para cada pareja de oligonucleótidos, y los números indican las coordenadas de posicionamiento. Para asegurar la presencia de un único producto amplificado, en todos los casos se analizó por fluorescencia su desnaturalización, entre 65°C y 95°C (“*melting analysis*”).

3. Síntesis de DNA viral

Para aislar el DNA, células de *Bacillus* sp. G1R o *B. subtilis* 110NA infectadas se recogieron a los tiempos indicados y se resuspendieron en tampón A (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM), incubándose con lisozima (3 mg/ml, durante 30 minutos a 37°C), RNasa (50 µg/ml, durante 10 minutos a 37°C) y 0.1% SDS (durante 10 minutos a 37°C) y posteriormente con proteinasa K hasta 50 µg/ml durante 3 horas a 37°C. Finalmente, el DNA se extrajo con fenol y se precipitó con etanol. La cantidad de DNA viral acumulado a lo largo del ciclo infectivo se determinó bien mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (p/v) (Bravo *et al.*, 1994), en donde los geles teñidos con bromuro de etidio fueron fotografiados mediante el sistema UVITecUV/WL 23, o bien mediante PCR en tiempo real.

4. Experimentos de fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en un fluorímetro Variant Cary Eclipse, utilizando un paso de celda de 2 mm a una temperatura de 15°C. El residuo de triptófano de la proteína p6 de Φ29 fue excitado a una longitud de onda de 290 nm y su emisión de fluorescencia se midió a 350 nm. Para determinar la constante de unión efectiva (K_{eff}) de la proteína p6 a diferentes fragmentos de DNA, se llevaron a cabo experimentos de titulación directa (Alma *et al.*, 1983; Schwarz y Watanabe, 1983). La proteína p6 se añadió a los distintos DNAs (20 µM, en pb) en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5,

MgCl₂ 10 mM y NaCl 50 mM. La medición de la emisión de fluorescencia se llevó a cabo tras haber agitado la muestra durante 15 segundos. Para determinar la K_{eff} , se llevaron a cabo procedimientos de ajuste previamente descritos (Alma *et al.*, 1983) y basados en la teoría de McGhee y von Hippel para la unión de proteínas a polinucleótidos (McGhee y von Hippel, 1974). El proceso de ajuste comenzó fijando el valor de Q_{max} (0.84) (González-Huici *et al.*, 2004c) y el tamaño del sitio de unión ($n=12$). El valor de la constante de emisión de fluorescencia, f_A , se determinó añadiendo cantidades crecientes de proteína y midiendo la intensidad de fluorescencia emitida (F_{OBS}) para cada concentración, en ausencia de DNA. El valor de f_A se obtuvo de la relación entre la F_{OBS} y la concentración total de proteína presente en el ensayo ($290 \mu\text{M}^{-1}$) (González-Huici *et al.*, 2004c). Se continuó el ajuste mediante el empleo de un algoritmo de iteración diseñado en nuestro laboratorio (Soengas *et al.*, 1994) determinándose el valor de la K_{eff} . También se estimó gráficamente la K_{eff} como se ha descrito (Schwarz y Watanabe, 1983): en una representación de la fracción de saturación (θ) frente a la concentración de proteína p6 libre, el valor de $[p6]_{\text{libre}}$ obtenido al extrapolar la mitad de la saturación corresponde a $1/K_{\text{eff}}$ (McGhee y von Hippel, 1974).

5. Clonajes

5.1 Clonajes en el plásmido pACYC184. Los extremos derecho (R) e izquierdo (L) del genoma de $\Phi 29$ se obtuvieron mediante digestión con las endonucleasas de restricción *EcoRV* y *DraI* de los plásmidos pR259 y pL259, respectivamente (González-Huici *et al.*, 2000), ambos derivados del plásmido pBlueKSp. La secuencia concatémica C(24), se obtuvo mediante digestión con *HindIII* y *BamHI* del plásmido p(24)₁₂ (Serrano *et al.*, 1993a) y posterior relleno con polimerasa Klenow para generar extremos romos. El fragmento del gen *nadB* de *E. coli* se obtuvo mediante PCR del DNA genómico de *E. coli* con polimerasa Vent y los cebadores específicos denominados U-nad y L-nad de secuencias AAACATCCGGGCCTGCTTG y AAATCACAGTGATTACGC, respectivamente (U indica “upper” y L “lower”). El fragmento obtenido se fosforiló con PNK. En la Figura 11 se representa el origen de los distintos fragmentos, que posteriormente fueron insertados en el plásmido pACYC184

tras haberlo digerido con *EcoRV* y desfosforilado con fosfatasa alcalina (CIAP). La mezcla de ligación se llevó a cabo con ligasa de T4 y se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* NF-1. Los plásmidos recombinantes se detectaron mediante análisis de restricción con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III, que flanquean el lugar de inserción *EcoRV*. Finalmente se secuenciaron cada una de las construcciones.

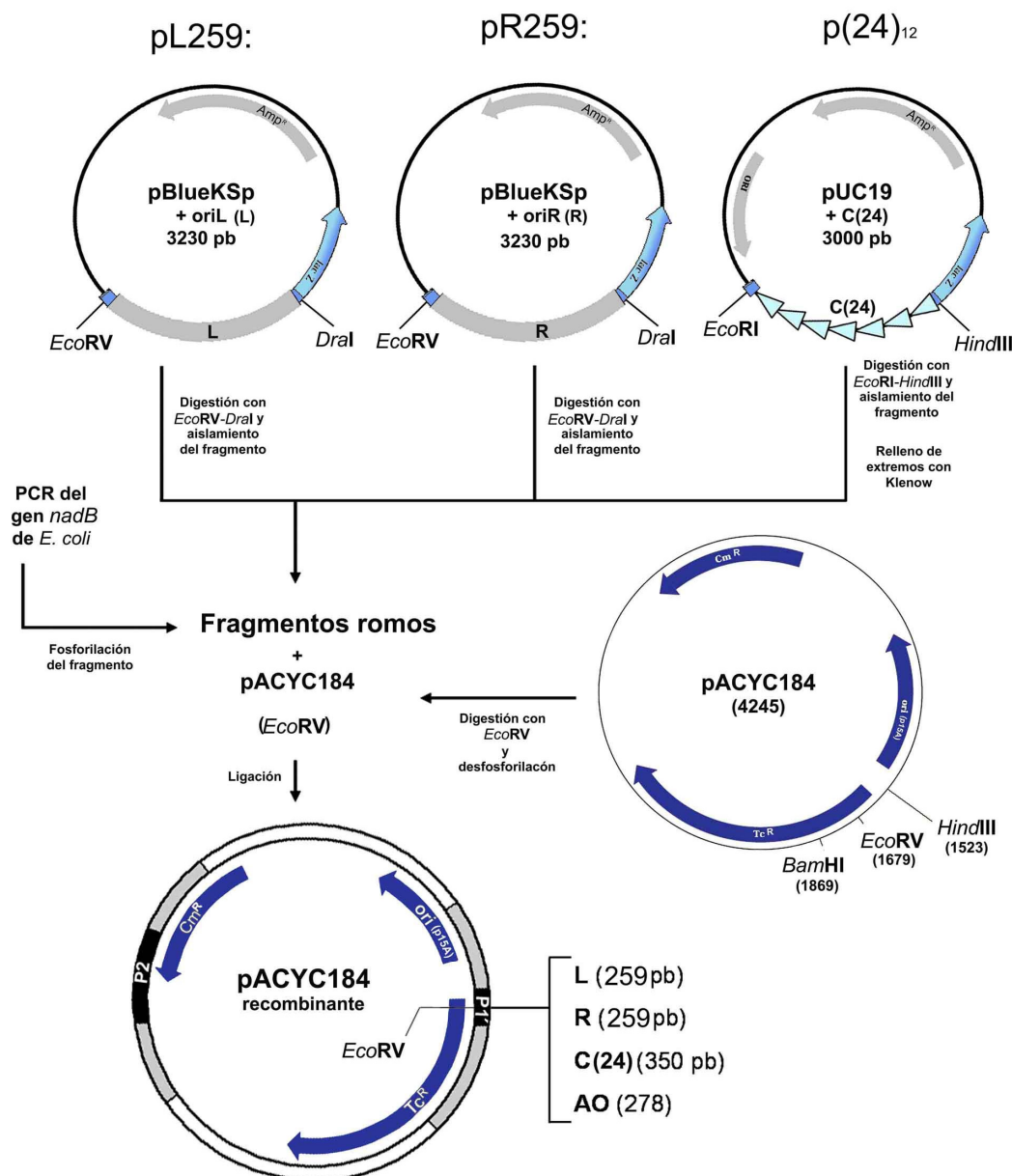


Figura 11. Construcción de recombinantes del plásmido pACYC184. Se representan los plásmidos pL259, pR259 y p(24)₁₂ a partir de los cuales se obtienen los fragmentos clonados en el plásmido pACYC184. L: extremo genómico izquierdo de Φ 29, R: extremo genómico derecho de Φ 29, C(24): secuencia concatemérica (representada mediante triángulos azules consecutivos) formada por 12 repeticiones de una secuencia de 24 pb por la que la proteína p6 muestra una unión preferencial, AO: secuencia del gen que codifica la aspartato oxidasa de *E. coli*. Amp^R: resistencia a ampicilina, Cm^R: resistencia a cloramfenicol, Tc^R: resistencia a tetraciclina, ori: origen de replicación.

5.2 Construcción y clonaje de las secuencias concatémicas 11IZQ, 12CENT, 12IZQ y C22. Se siguió el mismo procedimiento previamente descrito (Serrano *et al.*, 1993a) con ligeras modificaciones. Cada par de oligonucleótidos, purificados por HPLC, fue diseñado para que generara extremos cohesivos de 4 nt. En la Figura 12 se representan los pasos seguidos utilizando como ejemplo la secuencia C22, aunque el procedimiento fue el mismo para el resto de secuencias concatémicas. Se mezclaron 4 nmol de cada uno de los pares de oligonucleótidos complementarios (C22-1 y C22-2 en la Figura 12) y se fosforilaron en el extremo 5' con polinucleótido kinasa (PNK) durante 2 horas a 37°C. Después de eliminar las proteínas mediante tratamiento con fenol y cloroformo, se precipitó el DNA con etanol (EtOH), se disolvió en 50 µl de una solución Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, MgCl₂ 10 mM y se calentó 15 minutos a 70°C dejando enfriar la mezcla lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los *nicks* se ligaron con ligasa de T4 durante 4 horas a 23°C. El producto final se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se seleccionaron fragmentos entre ~270 y ~450 pb. Los fragmentos se purificaron del gel utilizando el *Quiaquick Gel Extraction Kit* de Quiagen. Se rellenaron con Klenow los extremos protuberantes y se ligaron con ligasa de T4 al vector pUC19 linearizado con *Sma*I y desfosforilado con CIAP. La inserción de los fragmentos en el sitio *Sma*I de pUC19 interrumpe el gen *LacZ*, permitiendo la detección de los plásmidos recombinantes (colonias de color blanco señaladas en rojo en la Figura 12) al transformar las mezclas de ligación en *E. coli* XL-1 Blue y crecer las células en presencia de X-gal (3 mg/100ml LB-agar) e IPTG (1 mM). La presencia de los insertos se comprobó con las endonucleasas *Eco*RI y *Hind*III que flanquean el lugar de inserción *Sma*I. Finalmente, se secuenció cada construcción. Los concatémicos lineales, empleados en los experimentos de fluorescencia (capítulo 1 de Resultados, apartado 1.4.4) se obtuvieron mediante PCR de las construcciones clonadas en pUC19, utilizando el par de cebadores U-pUC y L-pUC (U indica “upper” y L “lower”) que flanquean el lugar de inserción *Sma*I de los distintos concatémicos y cuya secuencia es TTGTAAAACGACGGCCAGTG y CAGCTATGACCATGATTACG, respectivamente. El concatémico C(24) se obtuvo directamente por PCR con los cebadores anteriores al encontrarse la secuencia previamente clonada en pUC19 (Serrano *et al.*, 1993a).

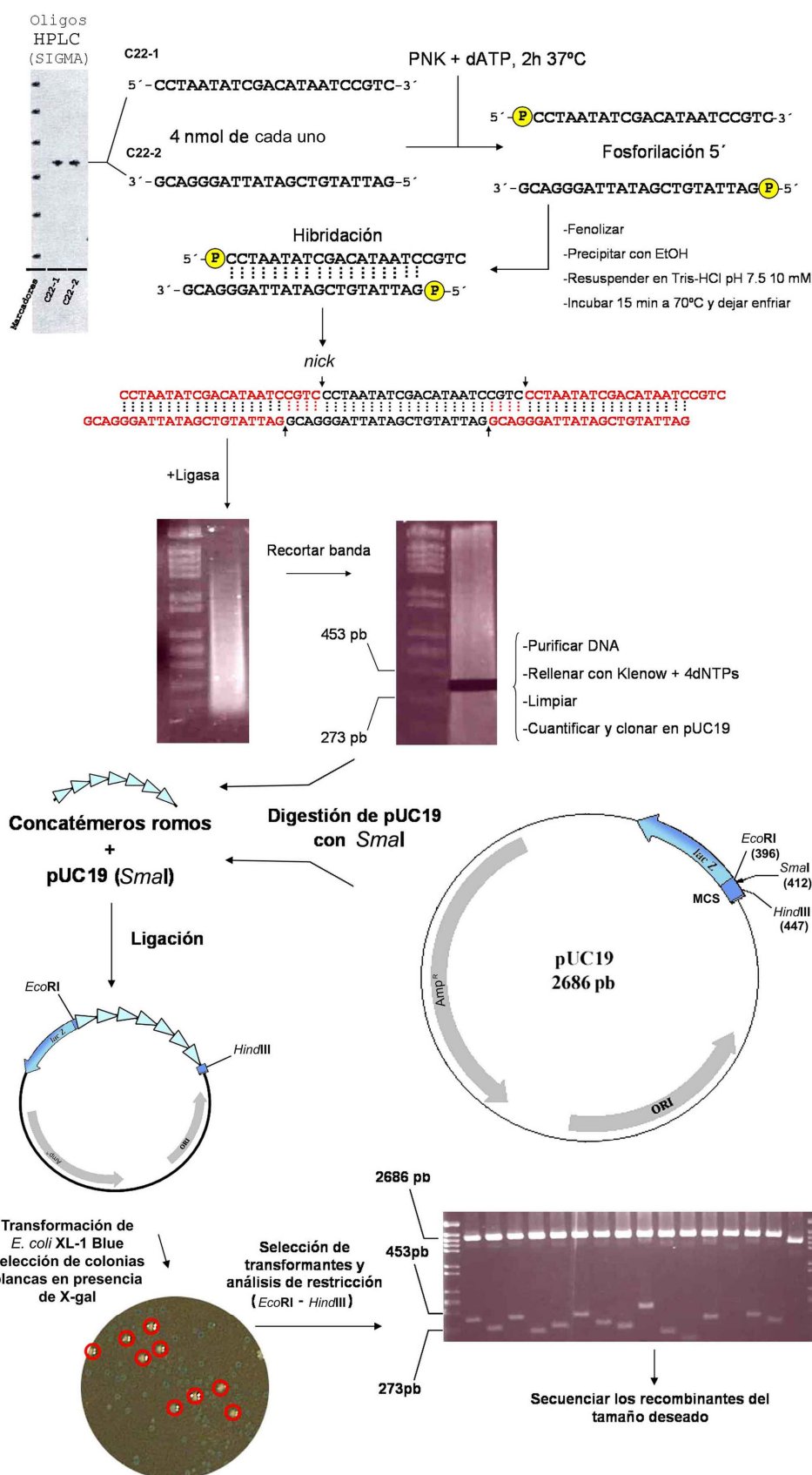


Figura 12. Construcción y clonaje de secuencias concatémicas en pUC19. Los grupos fosfato se representan en amarillo. Las secuencias concatémicas se representan mediante triángulos azules consecutivos. MCS: Sitio múltiple de clonaje, ori: origen de replicación, Amp^R: resistencia a ampicilina. Los nicks se han representado mediante flechas (↓) (↑). Los detalles se especifican en el texto. El tamaño de los concatémeros generados se seleccionó mediante recorte y purificación de banda.

5.3 Clonaje del gen 6 de GA-1 en *E. coli* BL21. El gen 6 del bacteriófago GA-1 se obtuvo del genoma de GA-1 mediante PCR, usando los oligonucleótidos denominados U-p6 y L-p6 (U indica “upper” y L “lower”), de secuencias TGTTTCCTAGCGCTGCAGTTTAAAATTATA y GTATATCATAAGGGCTGCAGATTACAAAC, respectivamente, diseñados para introducir dos sitios *Pst*I (subrayados) al comienzo y al final del gen. El producto amplificado, que contiene su propia secuencia de Shine-Dalgarno (SD), se clonó en el sitio *Pst*I del vector de expresión pT7-4 (Tabor y Richardson, 1985), previamente desfosforilado con fosfatasa alcalina (CIAP), que confiere resistencia a ampicilina y contiene el promotor Φ 10 de la RNA polimerasa de T7. La ligación del vector con el gen 6 se llevó a cabo con ligasa de T4 (ver Figura 13) y se transformó *E. coli* XL-1 Blue seleccionando los transformantes creciendo en presencia de ampicilina (100 μ g/ml). La incorporación del inserto se comprobó por análisis de restricción con *Pst*I y la orientación mediante secuenciación. La construcción secuenciada definitiva se introdujo finalmente en *E. coli* BL21 (DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del operón lac (Studier y Moffatt, 1986).

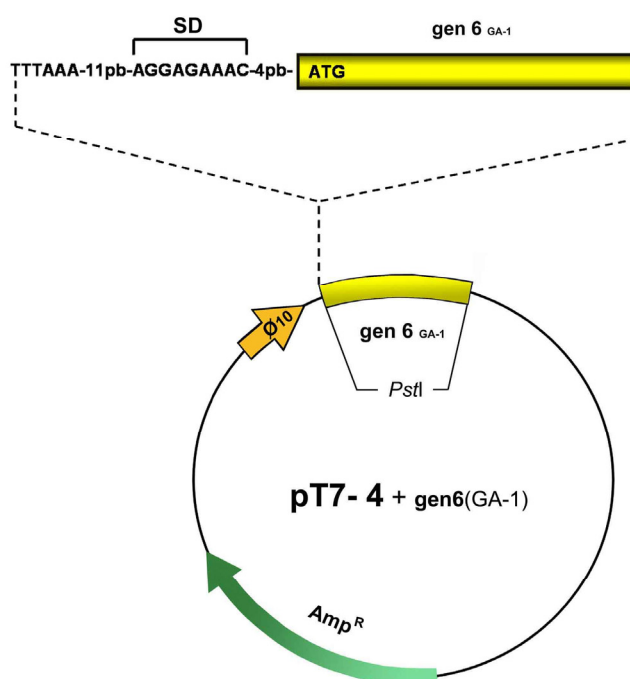


Figura 13. Construcción del plásmido recombinante pT7-4+gen6(GA-1). El gen 6 del bacteriófago GA-1 (en amarillo) fue insertado en la diana *Pst*I del vector pT7-4. Se muestra ampliada la parte 5' del gen con el ATG iniciador. SD: Shine-Dalgarno, Amp^R (verde): resistencia a ampicilina, Φ 10 (naranja): promotor específico de la RNA polimerasa de T7.

5.4 Clonaje del gen 6 de GA-1 en *B. subtilis* 110NA. El gen 6 de GA-1 se obtuvo de la misma forma que en el apartado 5.3 anterior. El vector pPR54 (Serrano-Heras *et al.*, 2005) se digirió con *Pst*I y se ligó con el gen 6 utilizando ligasa de T4 (ver Figura 14). Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *B. subtilis* YB886 (Rottländer y Trautner, 1970; Yasbin *et al.*, 1980). La presencia del gen 6 se detectó mediante análisis de restricción con *Pst*I y se determinó la orientación correcta por secuenciación. Con la construcción definitiva se transformaron células competentes de 110NA, donde se comprobó la expresión termosensible de la proteína p6 de GA-1 mediante *Western-blot* (Figura 51, página 88).

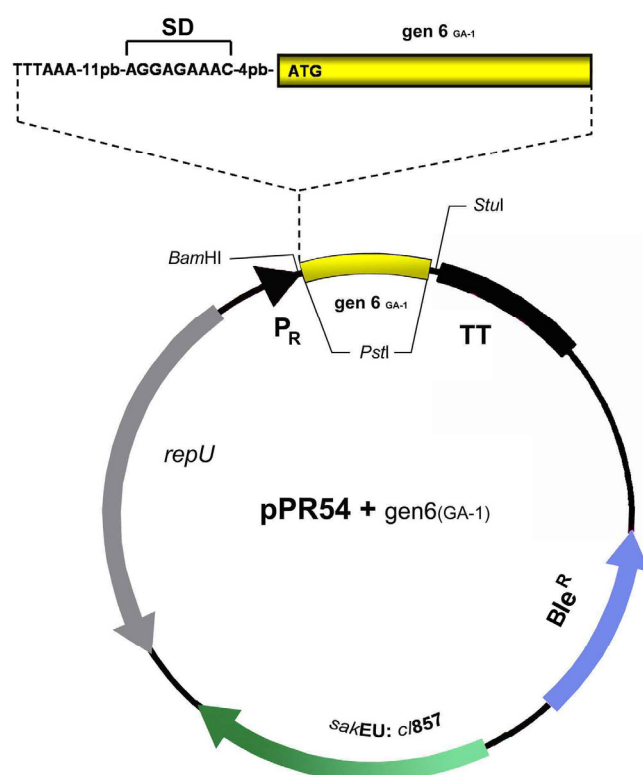


Figura 14. Construcción del plásmido recombinante pPR54+gen6(GA-1). El gen 6 del bacteriófago GA-1 (amarillo) fue insertado en la diana *Pst*I del vector pPR54. Se muestra ampliada la parte 5' del gen con el ATG iniciador. SD: Shine-Dalgarno, TT (negro): terminador de la transcripción, *sakEU:cI857* (verde): es un casete que codifica una versión termosensible del represor cI de λ (Breitling *et al.*, 1990), *repU* (gris): codifica una proteína de iniciación de la replicación plasmídica, Ble^R (azul): resistencia a bleomicina.

6. Transformación de *B. subtilis* 110NA y YB886 y *B. sp.* G1R.

Las transformaciones de *Bacillus* se llevaron a cabo según el método de Rottländer y Trautner (1970).

Obtención de células precompetentes. Cada una de las cepas se creció a 37°C en medio HS (K_2HPO_4 1.4% p/v, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2% p/v, KH_2PO_4 0.6% p/v, citrato trisódico 0.1% p/v, casaminoácidos 0.02% p/v, glucosa 0.5% p/v, extracto de levadura 0.1% p/v y $MgSO_4$ 5 mM) hasta llegar a una $D.O_{560nm}$: 0.8; media hora después se adicionó glicerol a cada cultivo hasta un volumen final del 10%. Se tomaron alícuotas de 500 μ l y se almacenaron a -70°C.

Obtención de células competentes y transformación. Las alícuotas anteriores se diluyeron en 4.5 ml de medio LS (K_2HPO_4 1.4% p/v, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2% p/v, KH_2PO_4 0.6% p/v, citrato trisódico 0.1% p/v, glucosa 0.5% p/v, casaminoácidos 0.01% p/v, extracto de levadura 0.1% p/v, espermina 0.5 mM y $MgSO_4$ 5mM), y se creció el cultivo a 30°C con agitación suave. A continuación se juntaron 300 μ l de células competentes con las mezclas de ligación correspondientes o DNAs plasmídicos, según la situación, durante 30 minutos a 30°C. Las células transformadas se crecieron en medio selectivo con fleomicina (0.8 μ g/ml).

7. Tratamiento y purificación de proteínas

7.1 Electroforesis de proteínas. Las electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se realizaron según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles en gradiente del 10-20% (p/v) de acrilamida para la proteína p6 de GA-1 y del 15% (p/v) para las proteínas p6, p16.7 y p17 de Φ 29. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie.

7.2 Detección de proteínas mediante “Western-blot”. Las proteínas, tras su separación por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) a 100 mA durante 60 minutos a 4°C. El tampón de transferencia contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v). Las membranas se lavaron con PBS 1X y Tween 20, 0.05% (v/v), se sumergieron en metanol durante 15 segundos y se secaron con papel Whatman 3MM. Posteriormente las membranas fueron incubadas durante 60 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos específicos contra las proteínas indicadas, usando siempre diluciones 1/2000 de cada antisuero, en 1% (p/v) de leche desnatada en PBS

1X y Tween 20, 0.05% (v/v). Para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo, se usaron anticuerpos conjugados con peroxidasa (utilizando una dilución 1/4000) y reactivos de detección ECL (*Enhanced Chemiluminescent Luminol*) de Amersham Biosciences.

7.3 Expresión y purificación de la proteína p6 de GA-1. Células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pT7- 4+gen6(GA-1), se crecieron a 30°C en 3.2 litros de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0.6. Una hora después, la expresión de la RNA polimerasa de T7 se indujo con IPTG 1 mM, durante 30 minutos. Se añadió rifampicina (100 µg/ml) para inhibir la transcripción celular y se recogieron las células tras incubarlo el cultivo en estas condiciones durante 90 minutos más. La inducción de la proteína p6 de GA-1 se muestra en la Figura 15.

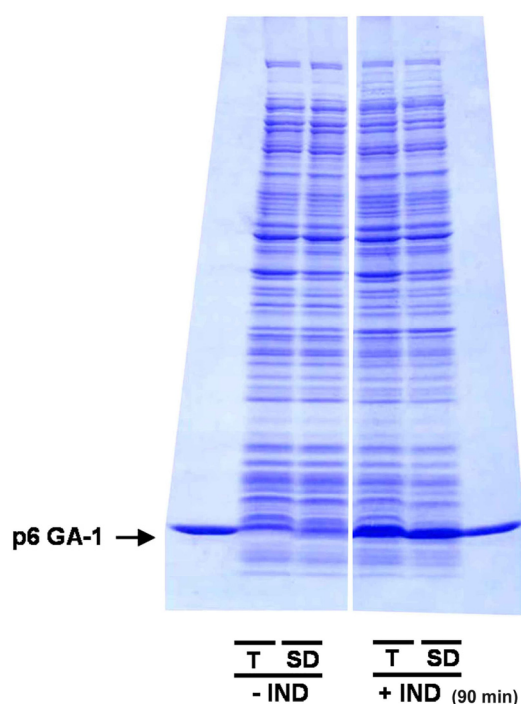


Figura 15. Inducción de la proteína p6 de GA-1 en células de *E. coli* BL21(DE3). La inducción de la proteína se llevó a cabo como se indica en el texto. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida en gradiente 10-20%. IND: inducido, T: fracción total (lisado), SD: fracción soluble, obtenida tras centrifugar el lisado a 27000xg. A la derecha e izquierda del gel se muestran marcadores de proteína pura.

Todos los pasos siguientes se llevaron a cabo a 4°C. Las células se lisaron mecánicamente utilizando alúmina y se resuspendieron en tampón 6 (B6, con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 7 mM,

glicerol 5%) con NaCl 0.9 M. Se eliminó la alúmina mediante centrifugación durante 5 minutos a 500xg. El lisado se centrifugó a 27000xg durante 15 minutos, obteniéndose la fracción denominada SHV. El DNA se eliminó precipitándolo con polietilenimina (PEI), tras centrifugar a 23000xg durante 10 minutos. El polication se añadió al 0.1% final por cada 40 unidades de D.O₂₆₀ del SHV. La proteína presente en el sobrenadante (fracción SPEI 0.9 M NaCl) se diluyó hasta 0.35 M NaCl, utilizando B6 con 0.04% final de PEI. Después de centrifugar 15 minutos a 27000xg, la mayor parte de los contaminantes se encontraron en el sobrenadante (fracción SPEI* 0.35 M). La proteína, presente en el sedimento, se solubilizó con B6 NaCl 1M y se precipitó con sulfato amónico (SA) al 65% incubando 20 minutos antes de centrifugar a 20000xg durante 25 minutos. El precipitado se lavó con B6 al 45% SA. El *pellet* obtenido se solubilizó con B6. Se centrifugó durante 15 minutos a 23000xg obteniéndose un sobrenadante fundamentalmente constituido por proteína p6 de GA-1. Se añadió glicerol hasta el 20% final y la muestra se pasó por una columna de fosfocelulosa en la que quedaron retenidos la mayoría de los contaminantes. La proteína p6 se eluyó con B6-NaCl 100 mM y se cromatografió en una columna de Heparina-agarosa (Hpa), que no retuvo la proteína p6 pero si los pocos contaminantes que quedaban. Finalmente se llevó el paso de columna a 140 mM NaCl y se pasó por una columna de Q-Sepharose (Q) eluyéndose con NaCl 0.2 M y SA 30%.

La Figura 16 muestra el gel de SDS-PAGE con todas las etapas de purificación. La proteína se dializó frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, glicerol 50 % (v/v), β -mercaptoetanol 7 mM y SA 0.1 M, antes de almacenarla a -70°C. La pureza de la proteína purificada, estimada por SDS-PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie, fue alrededor del 99%.

8. Obtención de anticuerpos específicos contra la proteína p6 de GA-1.

Se realizaron tres inoculaciones en un conejo de la variedad Outbred New Zeland crecido en condiciones de completa esterilidad. Antes de la primera inmunización, se extrajo sangre al animal para obtener el suero pre-inmune (pNi), necesario como control de señal inespecífica. Para la primera inmunización se utilizó una emulsión con 100 μ g de proteína purificada y

adyuvante completo de Freud (relación v/v 1:1 con el antígeno) en PBS y se administró mediante inoculación intradérmica. Transcurridas tres semanas se realizó una segunda inoculación, emulsionándose la misma cantidad de antígeno (100 µg) con adyuvante incompleto de Freud (relación v/v 1:1 con el antígeno) en PBS. Al cabo de otras tres semanas se realizó un tercer inóculo con las mismas características que el anterior pero en ausencia de adyuvante y, transcurridas dos semanas se extrajo la sangre del conejo y se aisló el suero policlonal anti-p6 de GA-1 (α p6 GA-1), ensayándose directamente primero mediante *Spot-blot* (ver Figura 17) y luego mediante *Western-blot* en extractos de *Bacillus* sp. G1R infectados con GA-1 (ver Figura 47, capítulo 2 de Resultados).

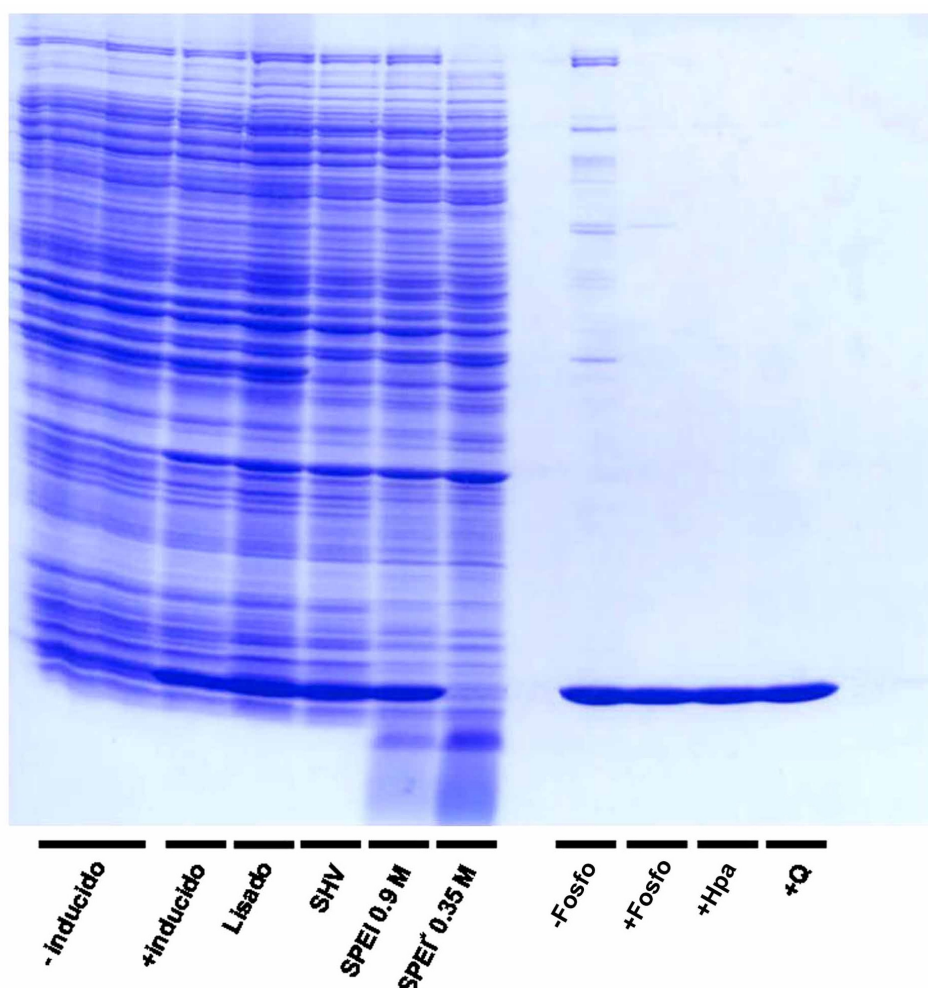


Figura 16. Resumen de las etapas de la purificación de la proteína p6 de GA-1. Se indican las fracciones que fueron cargadas en gel de poliacrilamida en gradiente 10-20%. SHV: sobrenadante del lisado con la proteína p6, SPEI 0.9 M: sobrenadante con polietilenimina y NaCl 0.9 M, SPEI* 0.35 M: sobrenadante con NaCl 0.35 M y 0.04% final de PEI, Fosfo: columna de Fosfocelulosa, Hpa: columna de Heparina-agarosa, Q: columna de Q-*Seapharose*. -: antes de pasar la muestra por la columna, +: después de pasar la muestra por la columna.

Finalmente, tras haber comprobado su efectividad, se utilizó para los experimentos de X-ChIP. Los resultados de estos experimentos se recogen en el capítulo 2 de Resultados.

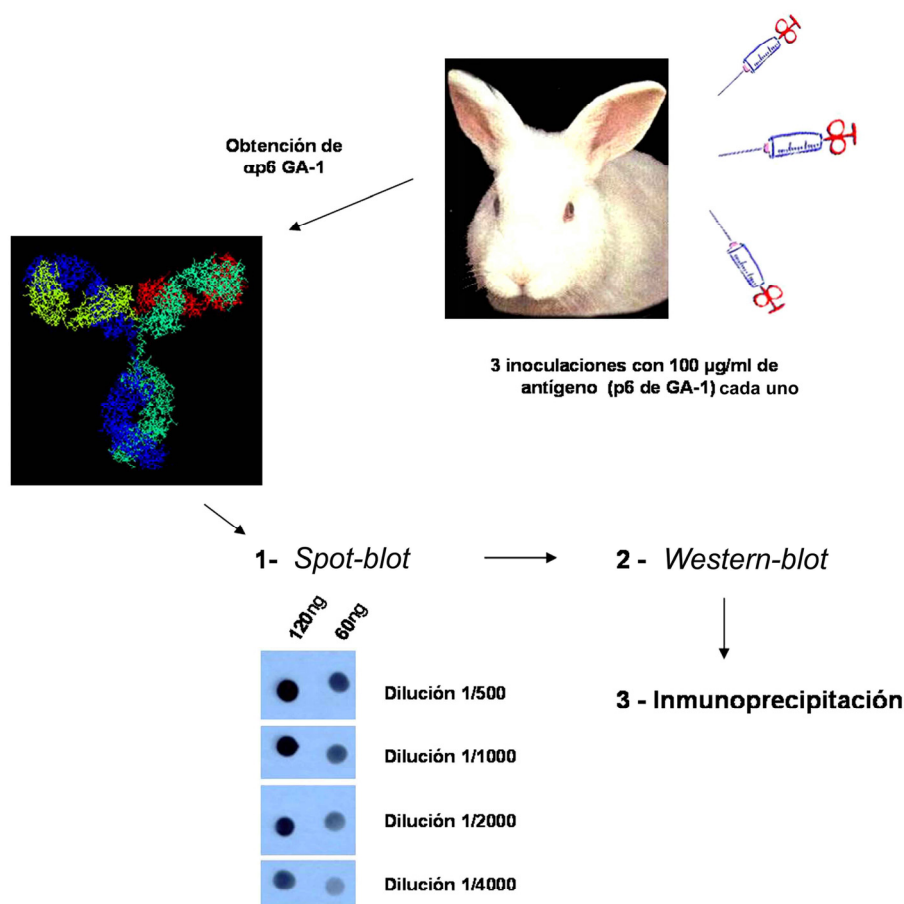


Figura 17. Esquema de la obtención y valoración del antisero contra la proteína p6 de GA-1. $\alpha p6$: anticuerpo específico contra la proteína p6 de GA-1. En el ensayo de *Spot-blot* las cantidades indicadas de proteína pura se fijaron directamente a membrana y se reveló con distintas diluciones del anticuerpo obtenido siguiendo la metodología del *Western-blot*.

9. Ensayos de iniciación de la replicación.

Los ensayos de iniciación de la replicación se realizaron esencialmente como se ha descrito (Serrano *et al.*, 1989). La mezcla de reacción usada contenía, en 25 μl , Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, MgCl_2 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, 0.1 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA), ditiotretol (DTT) 1 mM, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 0.25 μM (0.25 μCi), 250 ng de DNA polimerasa y 100 ng de TP de GA-1, así como las cantidades indicadas de proteína p6 de GA-1. Como molde se utilizó 500 ng de TP-DNA de GA-1 obtenido como se había descrito previamente (Peñalva y Salas, 1982). La mezcla de reacción se incubó 10 minutos a 30°C y

se detuvo con EDTA 10 mM. Las muestras se filtraron a través de una columna de Sephadex G-50 en presencia de SDS 0.1%. Los complejos de iniciación se analizaron por SDS-PAGE como está descrito (Peñalva y Salas, 1982). Los films se densitometraron en un aparato Molecular Dynamics 300A.

10. Cambios topológicos inducidos por la proteína p6 en el DNA de pUC19.

Los cambios topológicos inducidos por la proteína p6 se estudiaron básicamente como está descrito (Prieto *et al.*, 1988). Se incubaron, en 20 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 0.1 mM y 30 μ g/ml de BSA; 0.5 μ g del plásmido pUC19 superenrollado negativamente en presencia o ausencia de 5.5 ó 10.5 μ g de proteína p6 de GA-1 purificada. Después de 15 minutos de incubación en hielo se añadieron a las mezclas 2 unidades de topoisomerasa I y se incubaron 30 minutos a 37°C. Las reacciones se detuvieron añadiendo SDS hasta una concentración final del 1% y las muestras se fenolizaron y precipitaron con etanol.

Los topoisómeros se analizaron por electroforesis bidimensional en geles de agarosa al 1% en TBE (Tris-borato 90 mM y EDTA 2 mM); la primera dimensión se corrió a 35 V durante 14 horas. Los geles se sumergieron en una solución de TBE con 0.7 μ g/ml de cloroquina durante 3 horas y se continuó la electroforesis en dirección perpendicular a la anterior a 100 V durante 3 horas (Wang *et al.*, 1983). Los geles se tiñeron sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio (5 μ g/ml) y, finalmente, se fotografiaron bajo iluminación UV.

11. Experimentos de ultracentrifugación analítica.

Los parámetros de formación de los complejos proteína p6-DNA en disolución (estequiometría, afinidad, grado de cooperatividad), se determinaron mediante métodos de ultracentrifugación analítica en sus modalidades de velocidad y equilibrio de sedimentación (Figura 18) (revisado en Howlett *et al.*, 2006). El dato experimental esencial para un ensayo de ultracentrifugación analítica es la distribución de la concentración de la muestra a lo largo de la celda de la centrífuga medida a diferentes intervalos temporales.

Sobre las macromoléculas sometidas a ultracentrifugación actúan diferentes fuerzas: la fuerza gravitacional, la de fricción y la de flotación.

En un experimento de **velocidad de sedimentación** las muestras se someten a un alto campo centrífugo lo que provoca que la fuerza centrífuga supere a la de difusión (fuerzas de fricción y flotación) produciéndose un transporte neto de materia en el sistema. Como resultado, las distintas especies presentes se fraccionan en función de su coeficiente de sedimentación (que depende de la masa, la densidad y la forma de las especies macromoleculares). El análisis de la dependencia temporal de los gradientes de soluto, formados en un experimento de velocidad de sedimentación, permite determinar los coeficientes de sedimentación y estimar las correspondientes masas moleculares de cada especie implicada (ver Figura 18A).

En un experimento de **equilibrio de sedimentación** el campo centrífugo aplicado es moderado, de modo que, si la muestra se centrifuga durante un tiempo suficiente, se alcanza la condición de equilibrio en la que los gradientes de concentración de soluto no varían con el tiempo. En el equilibrio de sedimentación, los efectos opuestos de la centrifugación, que produce el alejamiento de las moléculas del centro de rotación, y de la difusión, que se opone a la formación de un gradiente de concentración de soluto en la solución, se compensan de manera que no existe un flujo molecular neto (Figura 18B). Los gradientes generados proporcionan información sobre la dependencia con la concentración macromolecular total de las masas moleculares (de flotación). Dicha dependencia puede ser modelada en el contexto de diferentes esquemas de formación de complejos macromoleculares, tanto en disoluciones diluidas como fisiológicamente aglomeradas (revisado en Rivas *et al.*, 2004; Howlett *et al.*, 2006). Los análisis de ultracentrifugación analítica de la proteína p6, DNA y mezclas p6-DNA se llevaron a cabo empleando varias concentraciones de proteína (comprendidas en el rango 1-100 μM) y dos concentraciones de DNA (0.0023 y 0.1 μM). Todas las muestras fueron equilibradas en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, MgCl_2 10 mM y NaCl 50 mM, a menos que se especifique lo contrario (experimentos en alta fuerza iónica, con 500 mM de NaCl).

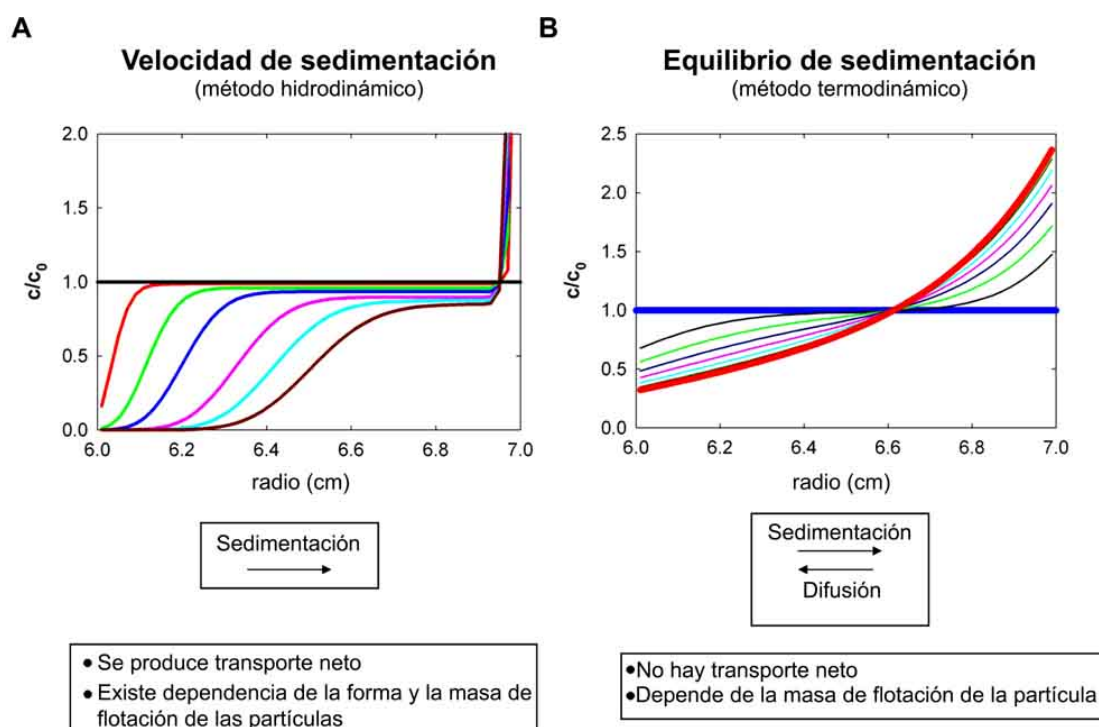


Figura 18: Esquema de las dos aproximaciones experimentales en las técnicas de ultracentrifugación analítica: velocidad y equilibrio de sedimentación. c/c_0 es la concentración de proteína normalizada por la concentración inicial de partida (línea en negro, parte A; línea en azul, parte B). **A:** Perfiles de velocidad de sedimentación de una macromolécula sometida a una elevada velocidad angular (velocidad de sedimentación). Los sucesivos perfiles se corresponden con diferentes tiempos. **B:** Aproximación al equilibrio de sedimentación de una macromolécula sometida a velocidad angular moderada. Los sucesivos gradientes se corresponden con diferentes tiempos. El gradiente final (representado con una línea más gruesa roja) es el que se obtiene una vez alcanzado el equilibrio de sedimentación.

11. 1. Análisis de velocidad de sedimentación. Los experimentos de velocidad de sedimentación se llevaron a cabo a 30000 rpm y 15°C en una ultracentrífuga analítica modelo Beckman Optima XL-A, equipada con un dispositivo de medida de absorción óptica ultravioleta-visible. Las muestras se centrifugaron en un rotor An60Ti, utilizando celdas de doble sector (de 400 μ l de volumen) con ventana de cuarzo de 12 mm de paso óptico. Se tomaron medidas a intervalos de 5 minutos a las longitudes de onda de 260 y 275 nm. Las distribuciones $c(s)$ de coeficientes de sedimentación se calcularon mediante el ajuste global de los datos experimentales utilizando las soluciones numéricas de las ecuaciones de transporte de macromoléculas en un campo centrífugo implementadas en el programa SEDFIT (Schuck, 2000). Dado que estos valores dependen de los parámetros físico-químicos de la disolución, los coeficientes de sedimentación se normalizaron a condiciones patrón (agua, 20°C y dilución infinita; van Holde, 1986) utilizando el programa SEDNTERP

(Laue *et al.*, 1992) obteniéndose los correspondientes coeficientes de sedimentación $s_{20,w}$ (que son los valores que se representan a lo largo de esta tesis doctoral). Estos parámetros de sedimentación junto con la información sobre las correspondientes masas moleculares obtenida mediante equilibrio de sedimentación (ver siguiente apartado), permitieron obtener las relaciones friccionales (f/f_0) de las distintas especies moleculares (proteína p6, DNA o complejos p6-DNA). Estas relaciones indican la desviación del comportamiento hidrodinámico con respecto al esperado para una macromolécula globular rígida (ésta tendría una relación f/f_0 muy próxima a la unidad), es decir, aportan información sobre la conformación global (incluyendo una estimación del grado de compactación del DNA) de las distintas especies que sedimentan (Waxman *et al.*, 1993).

El hecho de que las propiedades de sedimentación de las distintas especies macromoleculares empleadas (proteína p6, DNA o complejos p6-DNA) son muy diferentes, posibilitó analizar cuantitativamente la formación de complejos nucleoproteicos mediante velocidad de sedimentación. En estos experimentos las especies más grandes, conteniendo DNA, sedimentaron más rápidamente que la proteína no unida, por lo que se determinó la cantidad de proteína unida al DNA a partir de la disminución del área de la distribución de coeficientes de sedimentación de la proteína, al adicionar cantidades crecientes de proteína a una concentración fija de DNA. Para ello fue necesario corregir las señales mediante la determinación de la línea base (contribución a la absorbancia del material que no es proteína), lo que se consiguió deplecionando la proteína no unida al DNA tras centrifugar las muestras a 42000 rpm.

11. 2. Análisis de equilibrio de sedimentación. Los experimentos de equilibrio de sedimentación se llevaron a cabo a varias velocidades (8000, 10000 y 15000 rpm) y longitudes de onda (260, 275 y 290 nm), en columna corta (80-100 μ l), empleándose las mismas condiciones experimentales y la misma centrífuga descritas en el apartado 11.1 anterior. Las muestras se centrifugaron durante tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio (24-36 horas). La adquisición de la línea base para la corrección de las señales de absorbancia se realizó después de centrifugar la muestra a 40000 rpm. El

cálculo de la masa molecular de flotación (bM_w) de la proteína p6, DNA y las correspondientes mezclas de p6-DNA, se realizó ajustando los datos experimentales a la ecuación que describe la distribución radial del gradiente de concentración en el equilibrio de sedimentación para un soluto ideal, utilizando el programa MATLAB (cedido amablemente por el Dr. Allen Minton, NIH), basado en el algoritmo de conservación de señal (Minton, 1994) o el programa HeteroAnalysis (Cole, 2004), obteniéndose resultados muy similares mediante ambos análisis. Las masas moleculares de la proteína p6 y los DNAs empleados fueron determinados a partir de los valores experimentales de flotación, usando 0.734 y 0.55 (ambos en cm^3/g) como valores de volumen parcial específico de la proteína p6 (calculado a partir de su composición aminoacídica con el programa SEDNTERP; Laue *et al.*, 1992) y del DNA (calculado a partir de los valores estimados en la literatura para ácidos nucleicos; ver por ejemplo, Howlett y Davidson, 2000), respectivamente. Las propiedades de flotación de la proteína p6 y el DNA son muy diferentes, lo que dificulta el análisis necesario para determinar la masa molecular de los nucleocomplejos generados en las mezclas proteína p6-DNA. Por esta razón, los datos de equilibrio de sedimentación fueron analizados asumiendo la aproximación lineal para las masas de flotación:

$$bM_{w,ij} = i (bM_{w,A}) + j (bM_{w,B}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde ij representa el complejo A_iB_j (p6-DNA), y $bM_{w,A}$ y $bM_{w,B}$ son las masas moleculares de flotación de las especies puras A (p.e proteína p6) y B (p.e DNA), respectivamente (Rivas *et al.*, 1999b).

El análisis de la formación del complejo p6-DNA, en términos de estequiometría, afinidad y grado de cooperatividad se realizó mediante el ajuste de los datos de unión, obtenidos por velocidad de sedimentación o equilibrio de sedimentación, a la **función empírica de Hill** (Hatters *et al.*, 2002):

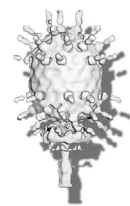
$$B(L) = B_{\max} (L/L_{50})^n / (1 + (L/L_{50})^n) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde $B(L)$ es la cantidad de proteína p6 unida al DNA a una concentración dada (L) de proteína libre (no unida), L_{50} equivale a la mitad de la capacidad

máxima de unión de proteína p6 (B_{\max}), y n es el índice de cooperatividad (si n es igual a 1, la unión al DNA de los protómeros de p6 o ligandos, se puede considerar no cooperativa; si n es menor que uno, la asociación es anti-cooperativa lo que quiere decir que la unión de nuevas moléculas de ligando se encuentra impedida debida a las moléculas de ligando unidas previamente al DNA, y si n es mayor que uno la reacción presenta cooperatividad positiva en la cual la unión de nuevas moléculas de ligando se encontraría favorecida por las moléculas de ligando previamente unidas al DNA).

Para determinar el efecto de la **aglomeración macromolecular** en la formación del complejo p6-DNA, se llevaron a cabo experimentos de equilibrio de sedimentación en presencia de 100 gramos/litro de dextrano T-10, macromolécula inerte que nos permite simular la elevada ocupación de volumen existente en el aglomerado interior celular (Hatters *et al.*, 2002). Estas disoluciones aglomeradas presentan una alta no-idealidad y, en estas condiciones, las masas de flotación experimentales de las diferentes especies moleculares no se corresponden con las que se obtendrían en disolución diluida; en general, estos valores son mucho más bajos debido a las repulsiones estéricas inespecíficas, siendo su valor muy dependiente de la forma y el tamaño tanto de las especies macromoleculares diluidas como de las que simulan la aglomeración. Estas complejidades no permiten emplear el mismo análisis de unión llevado a cabo en medios ideales (ver Ecuación 1). Sin embargo, un estudio reciente (Rivas y Minton, 2004) ha demostrado que la dependencia de la masa de flotación aparente (no corregida por el efecto de la no-idealidad) con la concentración de proteína a una concentración dada de agente aglomerante (en el caso de los resultados expuestos en esta tesis, se ha empleado 100 gramos/litro de dextrano T-10), puede ser estudiada mediante un análisis de titulación de la formación del complejo, de una forma muy similar a la empleada en una solución diluida. Así los parámetros del complejo (p.e la constante de afinidad) determinados a una concentración dada de agente aglomerante pueden ser comparados con aquellos obtenidos en su ausencia.

Resultados



CAPÍTULO 1. UNIÓN DE LA PROTEÍNA p6 AL DNA DEL BACTERIOFAGO Φ29

1.1 Unión *in vivo* de la proteína p6 al DNA de Φ29

Los cambios conformacionales del DNA inducidos por p6 tienen repercusiones funcionales. De esta forma, la unión de p6 a los orígenes de replicación (Prieto *et al.*, 1988) se ha relacionado con su capacidad de activar la iniciación de la replicación (Serrano *et al.*, 1989), y la unión a los promotores A2b, A2c y A3 estimula el paso de la transcripción temprana a la tardía (Elías-Arnanz y Salas, 1999); finalmente, la unión de la proteína p6 al origen de replicación derecho se ha asociado también con la represión del promotor C2, responsable de la transcripción de los genes tempranos 16.7 y 17 (Barthelemy *et al.*, 1989). Dada la abundancia de p6 en la célula infectada (Abril *et al.*, 1997), su capacidad para unirse *in vitro* a todo el genoma de Φ29 (Gutiérrez *et al.*, 1994) y su efecto pleiotrópico (Camacho y Salas, 2000), se ha propuesto para esta proteína un papel de organización y compactación del genoma viral. Sin embargo, todos los estudios de unión de p6 a DNA se han realizado *in vitro*, por lo que para confirmarlos era esencial el análisis de la unión de p6 a DNA *in vivo*. Este estudio se ha abordado mediante el entrecruzamiento con formaldehído de la proteína p6 con el DNA. Esta técnica, denominada X-ChIP (del inglés “*chromatin immunoprecipitation*”) ha permitido además analizar los efectos de diversas variables en la interacción p6-DNA, como se mostrará a lo largo de esta tesis. Los detalles de la técnica se especifican en el apartado 2 de Métodos. El formaldehído es un agente capaz de entrecruzar covalentemente dos grupos amino. En X-ChIP, uno pertenece a la proteína objeto de estudio y el otro a las bases nitrogenadas del DNA, formándose de esta manera enlaces covalentes DNA-proteína. La interacción se produce principalmente entre los residuos aminoacídicos de lisina y las bases nitrogenadas adenina, guanina y citosina, siendo la distancia de ~2 Å entre los grupos químicos involucrados en el enlace (Fujita y Wade, 2004). La reacción del formaldehído con los residuos de lisina comienza generando derivados metilol (proteína-NH₂ + CH₂O → proteína-NH-CH₂OH). La subsiguiente deshidratación de estos grupos conduce a la formación de una base de Schiff

que puede establecer entrecruzamientos proteína-DNA al interaccionar con el grupo amino de una base nitrogenada, produciéndose la unión covalente entre las dos moléculas (proteína-NH-CH₂-NH-base nitrogenada) (McGhee y von Hippel, 1975a; McGhee y von Hippel, 1975b). Las células tratadas con formaldehído son lisadas y el DNA se fragmenta por sonicación. A continuación, se inmunoprecipita el extracto con anticuerpos policlonales contra la proteína p6. La reversión de los entrecruzamientos por calor permite purificar el DNA coinmunoprecipitado con la proteína p6 y cuantificarlo mediante PCR en tiempo real. La eficiencia y especificidad en la recuperación del DNA unido a la proteína de interés, que es finalmente amplificado, depende de tres variables básicas que deben ser ajustadas para cada proteína. En primer lugar el tiempo de fijación: cuanto más prolongado, más enlaces DNA-proteína permitirá que se formen, pero al mismo tiempo supondrá una mayor modificación de la proteína, lo que empeora su posterior reconocimiento por los anticuerpos. En segundo lugar, la intensidad y tiempo de sonicación, que determina el tamaño medio de los fragmentos de DNA que finalmente se recuperarán en la inmunoprecipitación: a mayor tamaño, menor resolución de las regiones a las que se unen las proteínas y mayor arrastre inespecífico en la inmunoprecipitación; una sonicación excesiva empeora la eficiencia de la amplificación del DNA coinmunoprecipitado con la proteína; en general, se considera óptimo un tamaño donde la mayoría de los fragmentos tengan una longitud de 600-800 pb. Finalmente, las condiciones de inmunoprecipitación: es necesario utilizar una cantidad suficiente del anticuerpo específico y de proteína A-Sepharose, así como ajustar la concentración de detergentes para llegar a un compromiso entre eficiencia de inmunoprecipitación y especificidad. La afinidad de la proteína por cada región se puede expresar como coeficiente de inmunoprecipitación (IC), tal y como se indica en el apartado 2 de Métodos. Esta técnica ha sido descrita detalladamente (Orlando *et al.*, 1997; Hecht y Grunstein, 1999; Meluh y Broach, 1999; Orlando, 2000) y utilizada frecuentemente en células eucarióticas y procarióticas, incluyendo *B. subtilis* (Lin y Grossman, 1998; Quisel *et al.*, 1999; Ben-Yehuda *et al.*, 2005).

Las regiones del DNA de Φ 29 seleccionadas para estudiar la unión de la proteína p6, denominadas Φ 1- Φ 6, se encuentran distribuidas en distintos

puntos del genoma viral y su localización se muestra en la Figura 19. Las regiones $\Phi 1$ y $\Phi 6$ corresponden, respectivamente, al extremo izquierdo y derecho del genoma viral, dónde están localizados los orígenes de replicación. $\Phi 6$ incluye además el promotor temprano C2. La región $\Phi 2$ incluye la principal región involucrada en el control transcripcional del fago ya que contiene los promotores tempranos A2b y A2c y el promotor tardío A3. Las regiones $\Phi 3$, $\Phi 4$ y $\Phi 5$ corresponden a secuencias localizadas en los genes tardíos 8.5, 10 y 12, respectivamente.

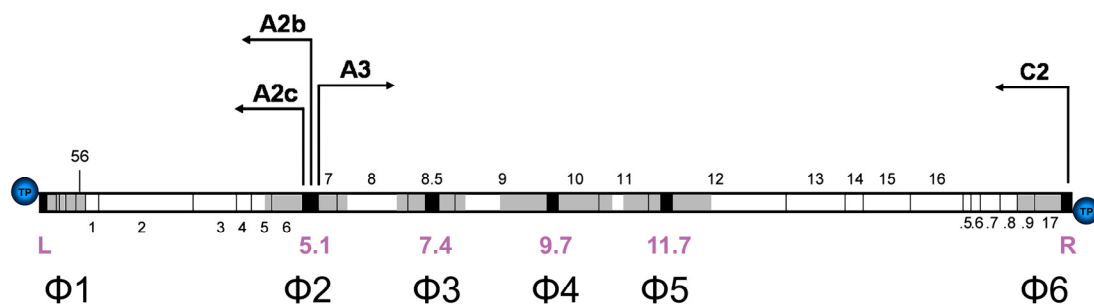


Figura 19: Localización genómica de las regiones del DNA de $\Phi 29$ analizadas para medir la unión de la proteína p6 *in vivo*. Se indican las posiciones de los genes numerados del 1 al 17; los números .5, .6, .7, .8, .9, representan los genes 16.5, 16.6, 16.7, 16.8 y 16.9, respectivamente. La proteína terminal (TP) unida covalentemente a cada extremo 5', se representa mediante círculos azules. Las flechas señalan los principales promotores virales: los promotores tempranos C2, A2b y A2c se transcriben hacia la izquierda y el promotor tardío A3 se transcribe hacia la derecha. Con rectángulos negros se muestran las secuencias seleccionadas para llevar a cabo las amplificaciones en tiempo real (utilizadas para medir la unión de p6 *in vitro* en el apartado 1.4.3 de este capítulo), denominadas L, 5.1, 7.4, 9.7, 11.7 y R, donde los números corresponden a las coordenadas medias de posicionamiento de estas regiones en el genoma viral (en Kb), que aparecen recogidas en la Tabla 1 (apartado 2 de Métodos). Las regiones a las cuales se ha estudiado la unión de p6 *in vivo*, $\Phi 1$ - $\Phi 6$, se muestran en gris.

Estas regiones, comprenden no solo las secuencias amplificadas (~300 pb, en color negro), sino también los ~450 pb (en color gris) adyacentes, como se puede ver en la Figura 20, ya que el tamaño promedio del DNA sonificado es de ~750 pb. De esta forma, el análisis de inmunoprecipitación abarca ~1200 pb para cada región, a excepción de los extremos genómicos donde el registro abarca únicamente ~750 pb.

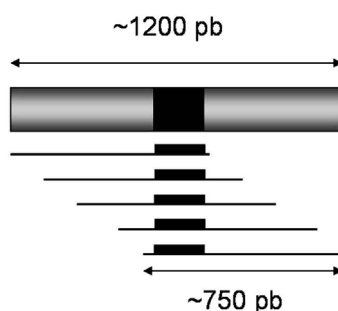


Figura 20: Detalle de la región promedio analizada para estudiar la unión de p6. El DNA es fragmentado por sonicación hasta alcanzar un tamaño promedio de ~750 pb. Cada región comprendería fragmentos solapantes que contendrían las secuencias amplificadas (rectángulos negros). De acuerdo con el tamaño de las secuencias amplificadas (~300 pb) y el tamaño de los fragmentos sonificados (~750 pb), cada región analizada de DNA abarca ~1200 pb. Este valor correspondería únicamente a 750 pb en el caso de las regiones $\Phi 1$ y $\Phi 6$ debido a su posicionamiento en los extremos genómicos, como se puede ver en la Figura 19.

Para determinar la unión de p6 al DNA, se crecieron células de *B. subtilis* 110NA a 30°C hasta una densidad de 10^8 células/ml, y se infectaron con el mutante de lisis retardada *sus14*(1242) utilizando una multiplicidad de infección 10. Se eligió el minuto 20 post-infección para llevar a cabo el entrecruzamiento ya que la replicación del DNA viral apenas acaba de comenzar y la concentración intracelular de p6 casi ha alcanzado su valor máximo. En cambio, a tiempos más tardíos, la concentración de DNA se incrementa más que la de proteína p6, lo que se traduce en una disminución de los valores de los ICs (ya que en la definición de IC el DNA total aparece en el denominador, como se indica en el apartado 2 de Métodos). De esta forma, se añadió formaldehído hasta el 1% final y cinco minutos más tarde se detuvo el entrecruzamiento. La unión de p6 a DNA se expresó como coeficiente de inmunoprecipitación (IC). En la Figura 21 se representan los ICs para las seis regiones del DNA de Φ 29 analizadas, Φ 1- Φ 6. Se pudo detectar unión de la proteína p6 a las seis regiones del DNA de Φ 29 estudiadas, como correspondería a una proteína *histone-like*. Estas regiones se encuentran distribuidas a lo largo del genoma viral y comprenden ~30% de la secuencia del fago (ver Figura 19, regiones en gris). La mayor afinidad de la proteína se registró por las regiones Φ 1 y Φ 6 situadas en los extremos genómicos mientras que la afinidad por las regiones internas fue menor, especialmente por la región Φ 2, que contiene la región de control transcripcional.

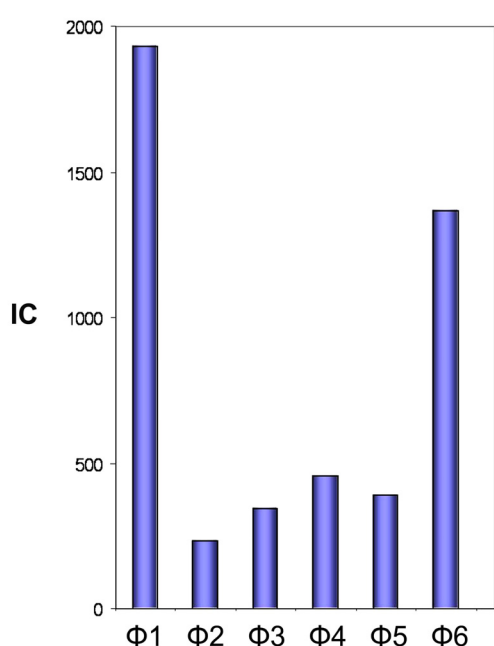


Figura 21: Unión de la proteína p6 al DNA de Φ 29 *sus14*(1242). Células de *B. subtilis* 110NA fueron infectadas a 30°C con *sus14*(1242) a m.d.i=10 y 20 minutos después una alícuota de 20 ml fue entrecruzada con formaldehído. Los valores de IC para cada región fueron; Φ 1: 1935, Φ 2: 230, Φ 3: 344, Φ 4: 458, Φ 5: 392, Φ 6: 1369. Los datos se obtuvieron en colaboración con Víctor González-Huici.

Como control adicional, se llevó a cabo una inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra la proteína p17, otra proteína temprana viral que no une DNA *in vitro* (Crucitti *et al.*, 1998). No se detectó unión de la p17 a las regiones analizadas anteriormente (resultado no mostrado), descartándose así la posibilidad de que los resultados hayan sido debidos a colisiones fortuitas entre las proteínas y el DNA, en vez de representar una interacción genuina.

1.2 Efecto del superenrollamiento en la interacción p6-DNA

Resultados previos con DNA plasmídico han indicado, tanto *in vivo* como *in vitro* (González-Huici *et al.*, 2004c), que la afinidad de unión de p6 es inversamente proporcional al grado de superenrollamiento negativo del DNA, de acuerdo con la capacidad de la proteína de mantener superenrollamiento positivo sobre el DNA que forma parte del nucleocomplejo (Serrano *et al.*, 1993a). Aunque el DNA del fago tiene una molécula de TP en cada extremo 5' de su genoma, y por lo tanto no se encuentra covalentemente cerrado, si podría encontrarse topológicamente restringido como se ha descrito para el fago T4 (Sinden y Pettijohn, 1982).

Para analizar esta posibilidad se estudió la dependencia de superenrollamiento en la unión de p6 al DNA de $\Phi 29$ *in vivo*. La unión de p6 se midió en presencia y ausencia de inhibidores de la girasa bacteriana (topoisomerasa II). Esta enzima produce superenrollamiento negativo del DNA cortando la doble hebra, para lo cual hidroliza ATP. La girasa es un tetrámero constituido por dos subunidades gyrA, con actividad endonucleolítica y ligasa, y dos subunidades gyrB, con actividad ATPasa. Uno de estos inhibidores, la novobiocina, inhibe la subunidad gyrB, disminuyendo el superenrollamiento negativo del DNA. Por lo tanto, si el DNA de $\Phi 29$ se encontrase topológicamente restringido, sería lógico esperar un incremento en la unión de p6 en presencia de novobiocina. Como control se empleó el ácido nalidíxico, otro inhibidor de la girasa que bloquea la subunidad gyrA, y por tanto no modifica la superhelicidad del DNA.

Así, se infectó *B. subtilis* 110NA/pPR55ow6 (cepa portadora del plásmido pRP55ow6, ver Figura 22) con $\Phi 29$ *sus14*(1242), tal y como se ha descrito en el apartado anterior. A los 20 minutos post-infección se entrecruzó

con formaldehído una alícuota control (C) y a otras dos alícuotas se les adicionó novobiocina (+Nov) o ácido nalidíxico (+Nal) (ambos a concentración final de 500 $\mu\text{g/ml}$) junto con cloramfenicol (34 $\mu\text{g/ml}$), incubándose durante 10 minutos antes de llevar a cabo el entrecruzamiento (apartado 2 de Métodos). La presencia de cloramfenicol aseguró que los niveles de p6 fuesen los mismos en todos los casos. En la Figura 23 se puede comprobar como la presencia de novobiocina estimula la unión de la proteína p6 de 23 a 35 veces con respecto al control sin novobiocina, excepto para la región $\Phi 2$ (~ 8 veces). Aunque la unión a todas las regiones del DNA de $\Phi 29$ se incrementa enormemente en presencia de novobiocina, las diferencias de unión entre ellas observadas en ausencia del inhibidor se mantienen cualitativamente. El ácido nalidíxico esencialmente no modifica los valores de los ICs del control.

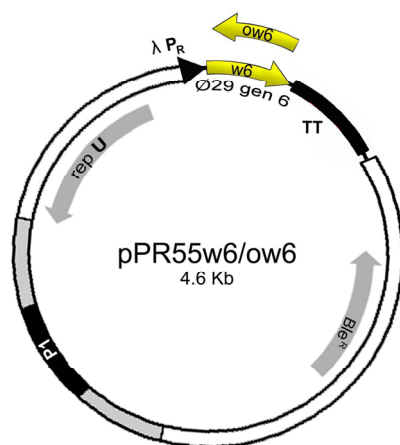


Figura 22: Mapa de los plásmidos pPR55w6 y pPR55ow6. Estos plásmidos (4.6 Kb), son derivados del plásmido pUB110 y contienen el gen 6 de $\Phi 29$ (flecha amarilla). La expresión del gen 6 se produce de forma constitutiva a partir del promotor P_R de λ en pPR55w6. En el caso de pPR55ow6 el gen 6 se encuentra en la orientación invertida respecto a P_R y no hay expresión. Se indican los genes que codifican la proteína de replicación repU y la resistencia a fleomicina (Ble^R). En negro se muestra la secuencia elegida para llevar a cabo la amplificación por PCR, en gris se muestra la región P1 elegida para analizar la unión de p6 *in vivo* al DNA plasmídico. TT: terminador de la transcripción.

Estos resultados indican que el DNA de $\Phi 29$, aunque no está covalentemente cerrado, se encuentra topológicamente restringido *in vivo*. Como control, se midió también la unión de p6 a la región P1 del DNA plasmídico pPR55ow6 (Figura 22) donde la novobiocina provocó un aumento de 16 veces en la unión. Este aumento está de acuerdo con la disminución del superenrollamiento negativo experimentada por el DNA plasmídico en presencia de novobiocina (González-Huici *et al.*, 2004c). No obstante, la unión de p6 a la región P1 es significativamente inferior en comparación con cualquiera de las regiones de $\Phi 29$, resultado que sugiere que el DNA viral se encuentra menos superenrollado negativamente que el DNA plasmídico.

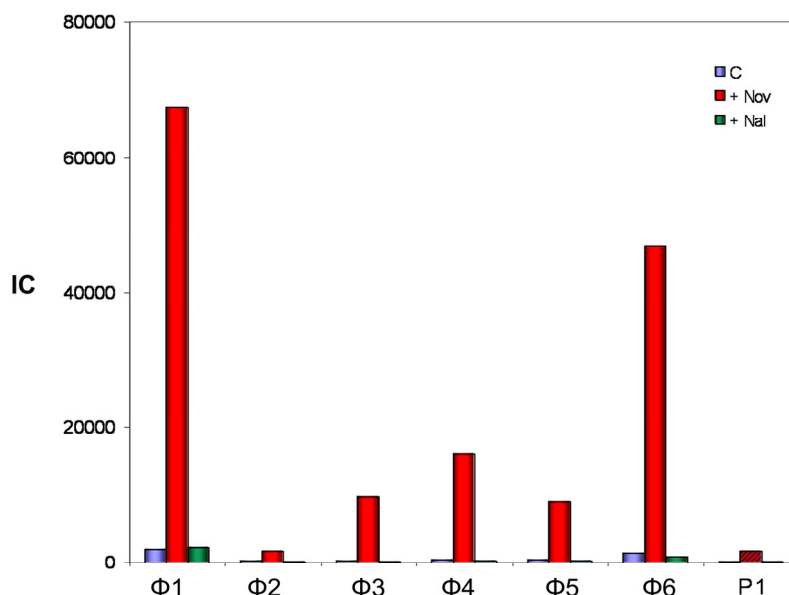


Figura 23: Efecto de la novobiocina y el ácido nalidíxico en la unión de p6 al DNA de Φ29 *sus14*(1242). Células de *B. subtilis* 110NA portadoras del plásmido pPR55ow6 fueron infectadas a 30°C con *sus14*(1242) a m.d.i.=10 y 20 minutos después una alícuota control (C) fue entrecruzada con formaldehído. Otras dos alícuotas fueron tratadas con 34 µg/ml de cloramfenicol junto con 500 µg/ml de novobiocina (+ Nov) o ácido nalidíxico (+ Nal) y entrecruzadas 10 minutos después. Los valores de IC para cada región fueron (C, + Nov, + Nal); **Φ1**: 1935, 67448, 2320; **Φ2**: 230, 1760, 105; **Φ3**: 344, 9753, 151; **Φ4**: 458, 16059, 254; **Φ5**: 392, 9063, 238; **Φ6**: 1369, 46812, 915 y **P1**: 100, 1645, 110 (columnas con trama diagonal). Los datos se obtuvieron en colaboración con Víctor González-Huici.

Para profundizar en el estudio de la restricción topológica del DNA de Φ29, se investigó el efecto de los inhibidores de la girasa bacteriana en la replicación del DNA viral. Debido a que los orígenes de replicación del DNA de Φ29 se encuentran localizados en los extremos del genoma, la progresión en dirección contraria de ambas horquillas de replicación genera superenrollamiento positivo por delante de ellas, debido a la separación de las hebras del DNA. La acumulación de este superenrollamiento afectaría gravemente al desarrollo de la replicación si el DNA lineal del fago estuviese topológicamente restringido, ya que no podría rotar libremente para eliminar las supervueltas acumuladas. Por lo tanto, en un DNA restringido topológicamente, se necesita la presencia de la girasa para eliminar el superenrollamiento positivo acumulado, permitiendo así su replicación. En el experimento mostrado en la Figura 24 se añadió novobiocina o ácido nalidíxico en el minuto 30 post-infección. La síntesis de DNA se midió a los tiempos indicados mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 24A) y PCR en tiempo real (Figura 24B). Ambos análisis indican que los dos inhibidores, especialmente la novobiocina, producen una inhibición de la replicación del DNA 10 minutos después de su adición.

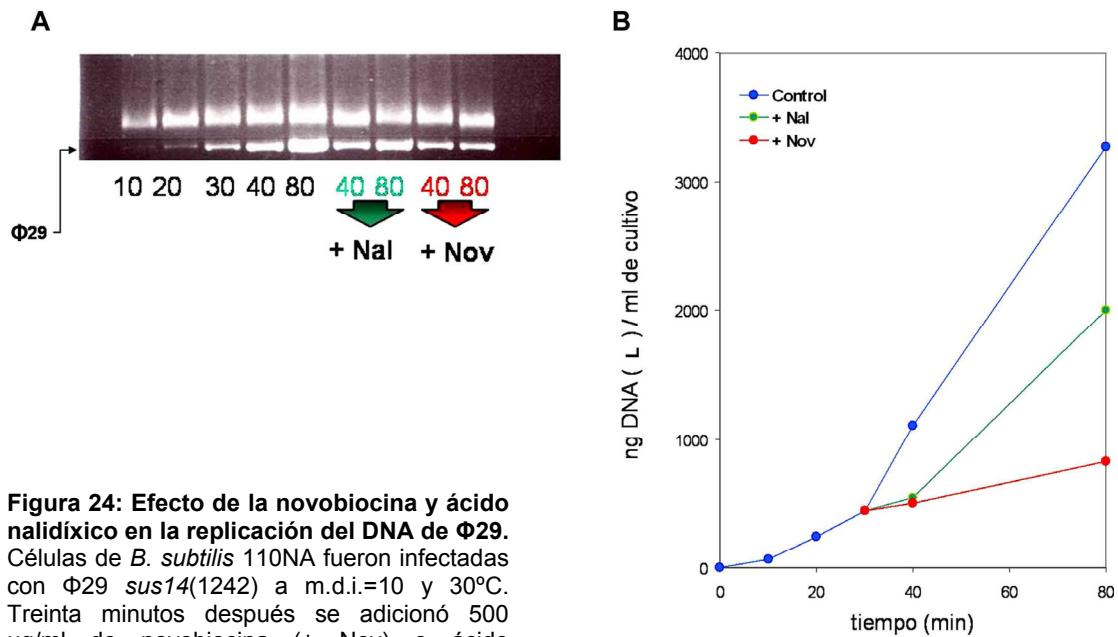


Figura 24: Efecto de la novobiocina y ácido nalidíxico en la replicación del DNA de Φ29. Células de *B. subtilis* 110NA fueron infectadas con Φ29 *sus14*(1242) a m.d.i.=10 y 30°C. Treinta minutos después se adicionó 500 µg/ml de novobiocina (+ Nov) o ácido nalidíxico (+ Nal) o nada (control). El DNA se extrajo a los tiempos indicados mediante fenolización y precipitación con etanol. **(A)** Gel de agarosa 0.8 % (p/v) donde la banda superior corresponde al DNA genómico celular y la banda inferior al DNA viral. **(B)** Cantidad de DNA de Φ29 determinada por PCR en tiempo real de la secuencia terminal correspondiente al extremo genómico izquierdo (L, región coloreada en negro, Figura 19), perteneciente a la región Φ1. Los resultados se expresan en ng de DNA por ml de cultivo.

Estos resultados, en conjunto, indican que el genoma de Φ29 se encuentra topológicamente restringido *in vivo*, y muestran la dependencia de girasa en la replicación del DNA de Φ29, describiéndose así la primera proteína celular involucrada en este proceso.

1.3 Efecto de las proteínas virales p1 y p17 en la interacción p6-DNA *in vivo*

Como se ha visto en el apartado anterior, la acción de la girasa, enzima que altera el superenrollamiento, afecta a la unión de la proteína p6 al DNA. Por esta razón la unión de p6 podría verse afectada por otras proteínas que alterasen el estado topológico del DNA viral. Existen varias razones para pensar que las proteínas virales p1 y p17, podrían estar implicadas en el mantenimiento de una correcta topología del genoma del fago y se exponen a continuación.

La proteína p1 es una proteína asociada a membrana (Bravo y Salas, 1997), capaz de formar láminas de protofilamentos *in vitro*, que podrían constituir un andamiaje sobre el cual se organizaría la replicación del DNA de

Φ29, de acuerdo con la deficiencia en replicación observada en un mutante *sus1*(629) (Bravo y Salas, 1998). No se ha obtenido ninguna evidencia de interacción directa entre p1 y el DNA viral, sin embargo p1 es capaz de interaccionar directamente con la TP (Bravo *et al.*, 2000). Por lo tanto, se propuso un modelo en el que el DNA de Φ29 estaría anclado a la membrana asociado al andamiaje constituido por la proteína p1, gracias a la interacción directa entre p1 y la TP (Bravo *et al.*, 2000). La generación de este complejo entre ambas proteínas, que organizaría y localizaría la replicación viral, podría estar involucrada en el mantenimiento de la restricción topológica observada en el DNA de Φ29 y por lo tanto influir en la unión de p6.

La proteína p17 ha sido implicada en la replicación del DNA de Φ29 (Crucitti *et al.*, 1998). Recientemente, también se ha propuesto que podría participar como una proteína integrante, junto con otras proteínas celulares, de un supuesto motor molecular (González-Huici *et al.*, 2004b) encargado de la internalización de la mitad izquierda del genoma viral durante el proceso de inyección. De esta forma, la proteína p17 podría estar involucrada en la unión a DNA de forma indirecta y por lo tanto contribuir a la restricción topológica del genoma viral.

Para comprobar si p1 o p17 están involucradas en el mantenimiento de la topología del genoma viral, se estudió la unión de p6 al DNA de los mutantes *sus1*(629) y *sus17*(112). Si la topología estuviese alterada en estos mutantes debido a la ausencia de estas proteínas, este fenómeno debería reflejarse en una unión alterada de p6 al DNA viral. Antes de llevar a cabo el análisis de X-ChIP, fue necesario determinar los tiempos post-infección en los que la concentración de proteína p6 y de DNA son equivalentes para ambos mutantes, ya que presentan cinéticas distintas de síntesis de DNA y proteína p6, tanto entre sí como respecto a un control. Se comenzó realizando una cinética de síntesis de DNA para el mutante *sus14*(1242), empleando PCR en tiempo real para determinar el momento exacto en el que comienza la replicación viral. Se infectaron células de *B. subtilis* 110NA (10^8 células/ml) a m.d.i.=10 y 30°C. Para sincronizar la infección se eliminó por centrifugación el fago no adsorbido, tras 3 minutos de preadsorción. En estas condiciones, aproximadamente el 50-60 % del fago inicial queda adsorbido de manera irreversible (resultado no mostrado). Como se muestra en la Figura 25, los

extremos genómicos (L y R, ver Figura 19) comienzan a replicar al mismo tiempo, en torno al minuto 17-20 post-infección, sin que la maquinaria replicativa parezca tener ninguna preferencia por uno de ellos respecto al otro. En paralelo se cuantificó la parte central del genoma, 9.7 (ver Figura 19), cuya replicación se detectó a los mismos tiempos que los extremos. La cinética representada en la Figura 25 permitió calcular el tiempo de duplicación del DNA viral *in vivo* entre los 20-25 minutos post-infección, resultando un valor de ~5 minutos, dato muy similar al obtenido *in vitro*, de 6 minutos (Blanco *et al.*, 1994).

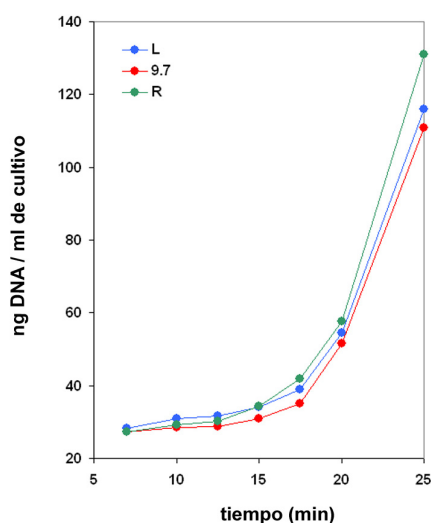
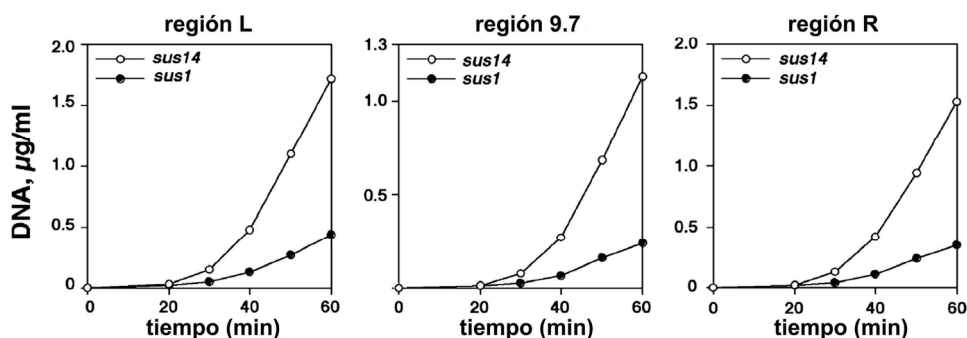


Figura 25: Replicación del DNA de $\Phi 29$ *sus14(1242)* *in vivo*. Células de *B. subtilis* 110NA fueron infectadas a 30°C con $\Phi 29$ *sus14(1242)* a m.d.i.=10; a los tres minutos post-infección se eliminó el fago no adsorbido mediante centrifugación del cultivo. Las células se resuspendieron en la misma cantidad de medio LB. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados, se extrajo el DNA mediante fenolización y se cuantificó, por PCR en tiempo real, las regiones L, R y 9.7 (ver Figura 19).

Una vez determinada la cinética de replicación del DNA del mutante control *sus14(1242)*, el estudio se hizo extensivo a los mutantes *sus1(629)* y *sus17(112)*, analizando la replicación a partir del minuto 20 post-infección, como se puede apreciar en la Figura 26. Para el mutante *sus1(629)* se empleó una m.d.i.=10 mientras que para el mutante *sus17(112)* fue de 3. Esta menor m.d.i. fue debida a que resultados previos indicaban que la ausencia de la proteína p17 se ponía de manifiesto a multiplicidades bajas (Crucitti *et al.*, 1998). Aunque la determinación de las cinéticas de replicación de los mutantes *sus1(629)* y *sus17(112)* se llevaron a cabo con la intención de contrastarlas con las cinéticas de síntesis de proteína p6 (se muestran más adelante, ver página 60) y encontrar condiciones donde la concentración de proteína y DNA fuesen equivalentes en los mutantes respecto a un control, el análisis de estos resultados (Figura 26) permitió llevar a cabo varias observaciones que se exponen a continuación.

A



B

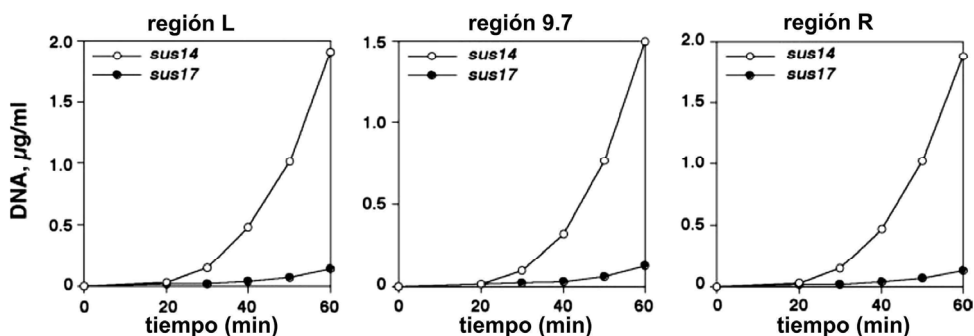


Figura 26: Síntesis de DNA viral en células infectadas con los mutantes *sus1*(629) y *sus17*(112). Células de *B. subtilis* 110NA (10^8 células/ml) fueron infectadas a 30°C con $\Phi 29$ *sus1*(629) (m.d.i.=10) (A) o *sus17*(112) (m.d.i.=3) (B). A los tiempos indicados se cuantificaron por PCR en tiempo real ambos extremos genómicos (L y R) así como la secuencia central del genoma (9.7) (ver Figura 19). Como control de replicación se utilizó el mutante *sus14*(1242) en las mismas condiciones de multiplicidad que las empleadas para cada mutante. Los datos se expresaron como microgramos (µg) de DNA por ml de cultivo.

Empleando PCR cuantitativa, se determinó la cinética de síntesis de las regiones del DNA de $\Phi 29$ correspondientes a ambos extremos genómicos (L y R) y a la región central del genoma (9.7). Así, se pudo ratificar de forma más precisa que la replicación está muy dificultada en el mutante *sus1*(629) (Bravo y Salas, 1998). La Figura 26A muestra una disminución en la pendiente de la curva de replicación con respecto a la infección desarrollada por el mutante *sus14*(1242). Como se ha comentado en la introducción, el DNA de $\Phi 29$ replica mediante un mecanismo que utiliza la proteína terminal (TP) como cebador (Figura 4), donde los dos orígenes de replicación se encuentran en ambos extremos del genoma viral. Por tanto, las dos horquillas de replicación se desplazan desde los extremos genómicos hacia la parte interna de la molécula. La mecánica de este proceso permite obtener información acerca de la iniciación de la replicación del DNA viral y su elongación, al hacer los cocientes entre las cantidades de extremos vs la cantidad de región central del genoma (asumiendo que *in vivo* las rondas de replicación solapadas se dan

con muy baja frecuencia). Por tanto, en un mutante que tuviese afectado el proceso de elongación, este cociente sería mayor que el obtenido para un fago salvaje. En células infectadas con el mutante *sus14*(1242), a los 20 minutos post-infección, los cocientes entre las regiones cuantificadas L/9.7 y R/9.7 son 2.01 y 1.67 respectivamente. En células infectadas con el mutante *sus1*(629), los valores son 1.86 y 1.57 para el mismo tiempo post-infección, indicando que no existe un impedimento en la etapa de elongación del DNA ya que, de ser así, los cocientes serían mayores que en las células infectadas con *sus14*(1242). Estos resultados sugieren por tanto que la proteína p1 se requiere para una iniciación eficiente de la replicación del DNA.

La replicación del DNA también se estudió de forma análoga en células infectadas con el mutante *sus17*(112) (ver Figura 19). La Figura 26B muestra que la replicación de las tres regiones se encuentra severamente impedida en el mutante *sus17*(112) con respecto al control *sus14*(1242). El comienzo de la replicación en el mutante *sus17*(112) está retrasado 20 minutos, lo que puede ser explicado debido al retraso en la internalización de la mitad izquierda del genoma viral (González-Huici *et al.*, 2004b), donde están codificadas la mayoría de las proteínas involucradas en replicación (ver mapa genético y transcripcional, Figura 2). Sin embargo, la tasa de replicación está enormemente disminuida, de tal forma que la cantidad promedio de DNA sintetizada en el mutante *sus17*(112) es 13.5 veces más baja que la encontrada en el mutante *sus14*(1242), en el minuto 60 post-infección. Como se observa en el mutante *sus1*(629), la replicación de la región central 9.7 se encuentra impedida en la misma medida que la replicación de las regiones L y R situadas en los extremos del DNA del fago, lo que sugiere que la elongación no es el paso afectado en la infección con el mutante *sus17*(112).

Tras determinar las cinéticas de síntesis del DNA para ambos mutantes, se determinaron las cinéticas de síntesis de proteína p6 mediante *Western blot* (Figura 27). La Figura 27A muestra que las cantidades de proteína p6 en el minuto 15 post-infección son equivalentes en el mutante *sus1*(629) con respecto al mutante *sus14*(1242). La Figura 27B se puede ver como no se aprecia una cantidad significativa de proteína p6 hasta el minuto 20 post-infección en células infectadas con el mutante *sus17*(112), mientras que una cantidad similar de p6 se sintetiza 10 minutos antes en la infección

desarrollada por el mutante *sus14*(1242). Este resultado también refleja el retraso en el proceso de inyección del DNA característico de este mutante.

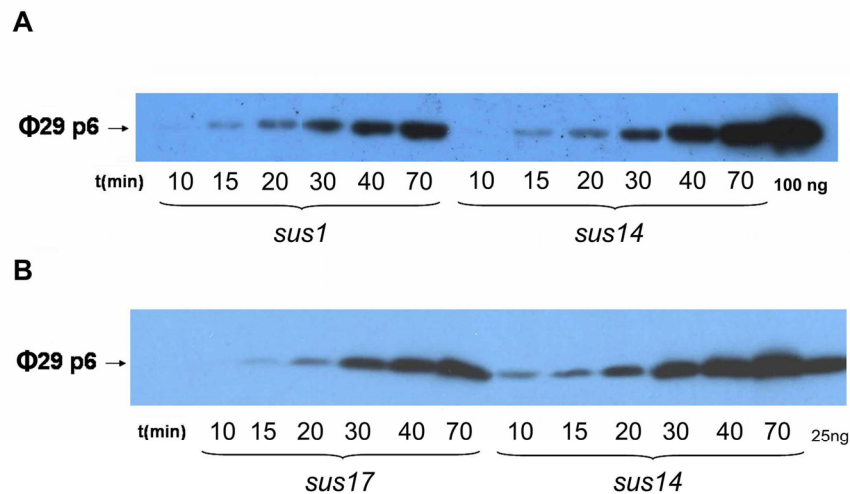


Figura 27: (A) Síntesis de proteína p6 en células infectadas con los mutantes *sus1*(629) y *sus14*(1242). La cantidad de p6 fue analizada por *Western blot* a los tiempo post-infección indicados. **(B) Síntesis de proteína p6 en células infectadas con los mutantes *sus17*(112) y *sus14*(1242).** La cantidad de p6 fue analizada por *Western blot* a los tiempo post-infección indicados. Tanto en A como en B, las infecciones se llevaron a cabo a 30°C y usando una m.d.i.=10 para el mutante *sus1*(629) y de 3 para el mutante *sus17*(112). A la derecha se muestra la cantidad de proteína pura utilizada como marcador.

Las cinéticas de replicación y de síntesis de proteína p6, permitieron determinar que la razón p6/DNA en un mutante *sus1*(629) en el minuto 15 post-infección, es equivalente a la razón encontrada en el minuto 15 post-infección en el mutante *sus14*(1242). Por otro lado, la razón p6/DNA encontrada en el mutante *sus17*(112) en el minuto 20 post-infección es equivalente a la razón encontrada en el minuto 10 post-infección para el mutante *sus14*(1242). Así, células de 110NA se infectaron con *sus1*(629) a m.d.i.=10 y *sus17*(112) a m.d.i.=3 (llevándose en paralelo una infección con *sus14*(1242) en las mismas condiciones empleadas para cada mutante). La unión de p6 se determinó mediante X-ChIP y PCR en tiempo real, realizando el entrecruzamiento en el minuto 15 post-infección para el mutante *sus14*(1242) y *sus1*(629); y en el minuto 10 post-infección para el mutante *sus14*(1242) a comparar con el entrecruzamiento en el minuto 20 en el mutante *sus17*(112). En ambos mutantes, se estudió la unión de p6 a DNA en ausencia y presencia de novobiocina (500 µg/ml), ya que en presencia del inhibidor de la girasa se reduce el superenrollamiento negativo, lo cual podría compensar posibles defectos de unión de la proteína p6 debidos a la ausencia de la proteína p1 ó p17. Las incubaciones en presencia de novobiocina se prolongaron durante 10

minutos (con 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloramfenicol), y a continuación se efectuó el entrecruzamiento. Los resultados se expresan como ICs en las Tablas 3 y 4 para *sus1*(629) y *sus17*(112), respectivamente.

Tabla 3: Unión de p6 en el mutante *sus1*(629). Los resultados se expresan como IC para las regiones del DNA de $\Phi 29$ ($\Phi 1$, $\Phi 2$, $\Phi 4$, $\Phi 5$ y $\Phi 6$, ver Figura 19; por simplificar la región $\Phi 3$ se excluyó del estudio), en presencia (+Nov) y ausencia (-Nov) de novobiocina. También se muestran las razones entre dichos ICs en células infectadas con *sus1*(629) y *sus14*(1242). Los datos se obtuvieron en colaboración con Víctor González-Huici.

Región	IC				IC(+Nov)/IC(-Nov)	
	- Nov		+Nov			
	<i>sus1</i>	<i>sus14</i>	<i>sus1</i>	<i>sus14</i>	<i>sus1</i>	<i>sus14</i>
$\Phi 1$	174	984	5319	14929	30.6	15.2
$\Phi 2$	65	172	303	543	4.7	3.2
$\Phi 4$	58	224	1983	4090	34.2	18.3
$\Phi 5$	63	261	1545	2559	24.5	9.8
$\Phi 6$	181	762	4595	9505	25.4	12.5

La Tabla 3 muestra, como era de esperar según los resultados obtenidos en el apartado anterior (1.2) de este capítulo, que la unión global de la proteína p6 aumenta en presencia de novobiocina, pero este incremento es casi el doble en células infectadas con el mutante *sus1*(629) que el incremento producido en células infectadas con el mutante *sus14*(1242), como se puede comprobar al comparar las razones entre los ICs obtenidos en presencia y ausencia de novobiocina. En consecuencia, la novobiocina es capaz de compensar parcialmente el defecto en la unión de la proteína p6 que presenta el mutante *sus1*(629). La posibilidad de que el efecto de la novobiocina en la unión de p6 se deba no tanto a cambios en superenrollamiento del DNA sino a la inhibición de alguna enzima que no fuese la girasa, se descartó mediante la infección del mutante de *B. subtilis gyrB*, insensible a novobiocina. En este caso la novobiocina no produjo incremento en la unión de p6 (resultados no mostrados), lo que descarta la posibilidad de que el efecto observado se deba a un mecanismo independiente de girasa. Dado que la proteína p1 se ha propuesto como integrante de una estructura asociada a membrana encargada

de anclar el DNA de $\Phi 29$ (Bravo *et al.*, 2000), estos resultados serían compatibles con un modelo en el cual, en ausencia de p1, el DNA de $\Phi 29$ experimentaría un incremento en la superhelicidad negativa que dificultaría la unión de p6. De esta forma, la proteína p1 proporcionaría al DNA de $\Phi 29$ la topología adecuada para permitir la unión óptima de p6, posibilitando su acción en replicación, control de la transcripción y organización global del genoma viral. El fenotipo defectivo en replicación del mutante *sus1*(629) se puede explicar, al menos en gran parte, debido al impedimento que presenta la proteína p6 en la unión a los orígenes de replicación del DNA viral.

La Tabla 4 muestra que la unión de p6 a las regiones del DNA de $\Phi 29$ indicadas (Figura 19), es más baja en células infectadas con *sus17*(112) en comparación con las células infectadas con *sus14*(1242): 3.9, 3.0, 2.9 y 1.9 veces para las regiones $\Phi 1$, $\Phi 4$, $\Phi 5$ y $\Phi 6$, respectivamente. En el caso de la región $\Phi 1$, la diferencia puede estar ligeramente sobreestimada ya que el proceso de inyección probablemente no se ha completado del todo en células infectadas con *sus17*(112) en estos instantes post-infección. De hecho, la unión a $\Phi 1$ es más baja que la registrada para $\Phi 6$, cuando cabría esperar una unión mayor, como se observa en células infectadas con $\Phi 29$ *sus14*(1242).

Tabla 4: Unión de p6 en el mutante *sus17*(112). Los resultados se expresan como IC para las regiones del DNA de $\Phi 29$ ($\Phi 1$, $\Phi 2$, $\Phi 4$, $\Phi 5$ y $\Phi 6$, ver Figura 19; por simplificar la región $\Phi 3$ se excluyó del estudio), en presencia (+Nov) y ausencia (-Nov) de novobiocina. También se muestran las razones entre dichos ICs en células infectadas con *sus17*(112) y *sus14*(1242) (N.D. significa "no detectado"). Los datos se obtuvieron en colaboración con Víctor González-Huici.

Región	IC				IC(+Nov)/IC(-Nov)	
	- Nov		+Nov			
	<i>sus17</i>	<i>sus14</i>	<i>sus17</i>	<i>sus14</i>	<i>sus17</i>	<i>sus14</i>
Φ_1	56	218	361	423	6.4	1.9
Φ_2	N.D.	N.D.	26	24	–	–
Φ_4	27	80	299	150	11.1	1.9
Φ_5	36	103	190	126	5.3	1.2
Φ_6	100	194	631	455	6.3	2.3

En ausencia de novobiocina la unión a la región $\Phi 2$, por la que p6 ha demostrado tener una afinidad particularmente baja, no fue detectable en

ambos mutantes debido a la baja cantidad de DNA y p6 bajo las condiciones experimentales utilizadas. El incremento de la unión de p6 en presencia de novobiocina en estos tiempos tempranos de infección es relativamente modesto debido a la baja concentración de p6 (Figura 27B); sin embargo, este incremento es 4.6 veces mayor como media en células infectadas con $\Phi 29$ *sus17*(112) en comparación con células infectadas con *sus14*(1242). Como consecuencia, los valores de los ICs no sólo alcanzan los valores obtenidos para el mutante *sus14*(1242), sino que llegan a ser incluso mayores, excepto para la región $\Phi 1$. Los resultados sugieren que en ausencia de la proteína p17, el genoma viral presenta un mayor grado de superenrollamiento negativo, como ocurría también en el caso del mutante *sus1*(629). Este cambio topológico experimentado en el DNA de $\Phi 29$ *sus17*(112) podría tener graves consecuencias en la replicación del DNA viral. Por lo tanto, en el mutante *sus17*(112), de acuerdo con la unión defectiva de la proteína p6 en sus orígenes de replicación, la replicación del DNA se vería afectada en la iniciación del proceso. Por tanto, p17 condiciona la unión de p6 al DNA de $\Phi 29$, de acuerdo con resultados obtenidos *in vitro* (Crucitti *et al.*, 2003). El hecho de que el efecto de p17 en la unión de p6 no se localice exclusivamente en los orígenes de replicación sino en la totalidad del genoma de $\Phi 29$ y que pueda ser mimetizado por la novobiocina, sugiere fuertemente que la proteína p17 podría participar en el mantenimiento de la topología del DNA de $\Phi 29$, lo que podría justificar la escasa replicación del DNA del mutante *sus17*(112).

1.4 Efecto de la secuencia nucleotídica

Como se ha demostrado en los apartados anteriores (1.1, 1.2 y 1.3), la proteína p6 se une *in vivo* con mayor afinidad a los extremos del genoma viral (regiones $\Phi 1$ y $\Phi 6$) con respecto a las regiones internas, fenómeno que ocurre tanto en presencia como en ausencia de novobiocina. Esta unión preferencial a las regiones $\Phi 1$ y $\Phi 6$, podría deberse fundamentalmente a dos razones: la existencia de dominios topológicos independientes (con distinto grado de superenrollamiento que condicionaría la unión de p6) en el genoma de $\Phi 29$ y/o la presencia de secuencias por las que p6 tendría mayor afinidad. Para poder discriminar entre estas dos posibilidades, se analizó la unión de p6 *in vivo*, a

diferentes regiones del genoma de $\Phi 29$ con la misma topología (subapartado 1.4.1); e *in vitro* mediante apantallamiento de fluorescencia (subapartado 1.4.3).

1.4.1 Unión de p6 a los extremos genómicos del DNA de $\Phi 29$ clonados en *E. coli*. Con la intención de disponer de distintas secuencias en un mismo contexto topológico, se clonaron los extremos del DNA de $\Phi 29$ en el plásmido pACYC184 (apartado 5.1 de Métodos, figura 11), insertándose en la región P1' (ver Figuras 11 y 29) y se transformaron células de *E. coli* productoras de p6. Esta cepa, denominada NF-1, porta el plásmido pRP8 con el gen 6 de $\Phi 29$ cuya expresión está regulada por el represor termosensible cI del fago λ (Pastrana *et al.*, 1985), alcanzándose el máximo de expresión a 42°C a los 15 minutos post-inducción, como se puede apreciar en *Western blot* de la Figura 28. El vector pACYC184 contiene el origen de replicación de p15A, lo que permite su coexistencia con plásmidos del grupo de compatibilidad ColE1, como es el caso del plásmido pRP8. Estas propiedades posibilitaron un diseño experimental donde, en el entorno intracelular de *E. coli*, la proteína p6 es sintetizada a partir del plásmido pRP8 por inducción termosensible, mientras que la unión de p6 es medida en la región P1' del plásmido pACYC184.

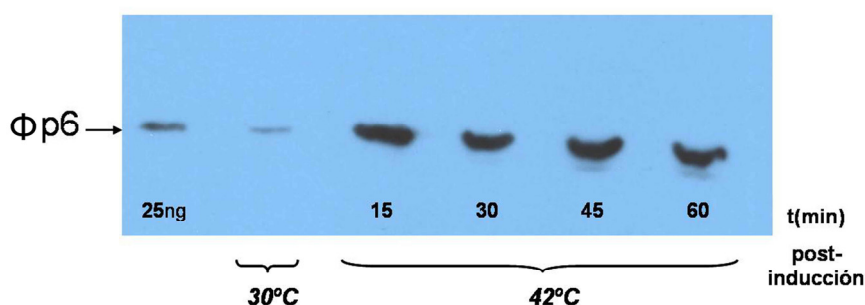
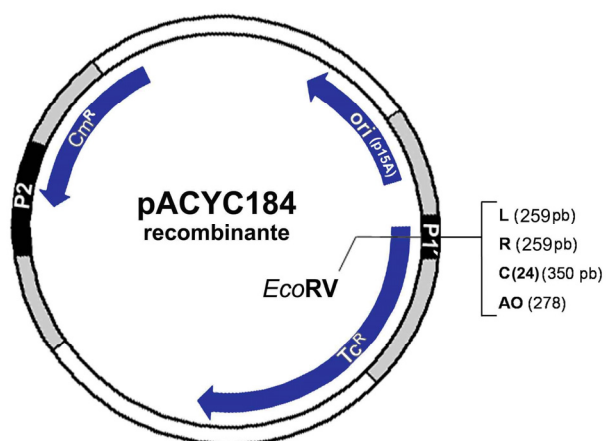


Figura 28. Inducción termosensible de la síntesis de proteína p6 en células de NF-1. Se crecieron células de *E. coli* NF-1 a 30°C hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml. La cantidad de p6 fue analizada por *Western blot* a los tiempo post-inducción indicados tras haber subido la temperatura a 42°C. También se muestra la cantidad de p6 sintetizada a 30°C en ausencia de inducción ("escape"). A la izquierda se muestra la cantidad de proteína pura utilizada como marcador.

Los insertos clonados en el plásmido pACYC184 se corresponden con las regiones amplificadas L y R mostradas en los apartados anteriores (contenidas en $\Phi 1$ y $\Phi 6$, respectivamente). También se midió la unión de p6 a una secuencia concatémica, C(24), por la cual p6 tiene una unión preferencial *in vitro* (Serrano *et al.*, 1993a) y que se analizará con más detalle

en el subapartado 1.4.4. Este concatémero está constituido por 12 repeticiones de una secuencia de 24 pb que teóricamente favorece la formación del complejo p6-DNA (Serrano *et al.*, 1989). Como control, se usó el plásmido pACYC184 con un inserto del mismo tamaño que los anteriores constituido por una secuencia no relacionada con el DNA de $\Phi 29$, concretamente un fragmento del gen que codifica la aspartato oxidasa de *E. coli* (AO). También se midió la unión a la propia región P1' sin inserto (-), con un tamaño total de 100 pb. Como control interno para cada construcción se midió la unión de p6 a la región P2, de tamaño similar al resto y situada en posición diametralmente opuesta a la región P1', como muestra la Figura 29. Para medir la unión de p6 a estas regiones, se crecieron células de *E. coli* NF-1/pRP8/pACYC184-recombinante a 30°C hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml, momento en el que se subió la temperatura a 37°C durante 15 minutos para inducir la síntesis de p6, y se adicionó novobiocina (500 μ g/ml) y cloramfenicol (34 μ g/ml), incubándolas durante 10 minutos antes de realizar el entrecruzamiento. La cantidad de proteína inducida alcanzó los mismos niveles en presencia de las distintas construcciones como se comprobó por *Western blot* (resultados no mostrados).

Figura 29. Mapa del plásmido pACYC184 y posicionamiento de las regiones P1' y P2. Cm^R: resistencia cloramfenicol, Tc^R: resistencia a tetraciclina, ori: origen de replicación. L: extremo izquierdo del DNA de $\Phi 29$, R: extremo derecho del DNA de $\Phi 29$, C(24): secuencia concatémérica, AO: fragmento de la secuencia del gen que codifica la aspartato oxidasa de *E. coli*. En paréntesis se indica el tamaño de los insertos.



Aunque *E. coli* no es hospedador natural de $\Phi 29$, la proteína p6 es capaz de unirse al DNA plasmídico en su entorno intracelular. Como muestra la Figura 30 la unión de p6 a la región concatémérica (C24) es 1.5 y 1.8 veces más alta que por las regiones L (extremo genómico izquierdo) y R (extremo genómico derecho), respectivamente, y unas 5 veces mayor que la registrada para la secuencia no relacionada con el DNA de $\Phi 29$ (AO). La unión de p6 a la secuencia L fue mayor que para la R, reproduciéndose la mayor afinidad de la

proteína por el extremo genómico izquierdo observada en las infecciones con $\Phi 29$ (apartados 1.1 y 1.2 del presente capítulo). La unión a la región P2 fue generalmente baja, especialmente cuando la unión a la región P1' fue mayor. Este resultado podría deberse a la inducción de supervueltas negativas compensatorias: dado que p6 induce superenrollamiento positivo al unirse al DNA, la unión a las secuencias de mayor afinidad en el DNA plasmídico (situado en la región P1'), generaría supervueltas negativas compensatorias que irían dificultando la unión de nuevas moléculas de proteína al DNA plasmídico (ver Figura 44 del Capítulo 2).

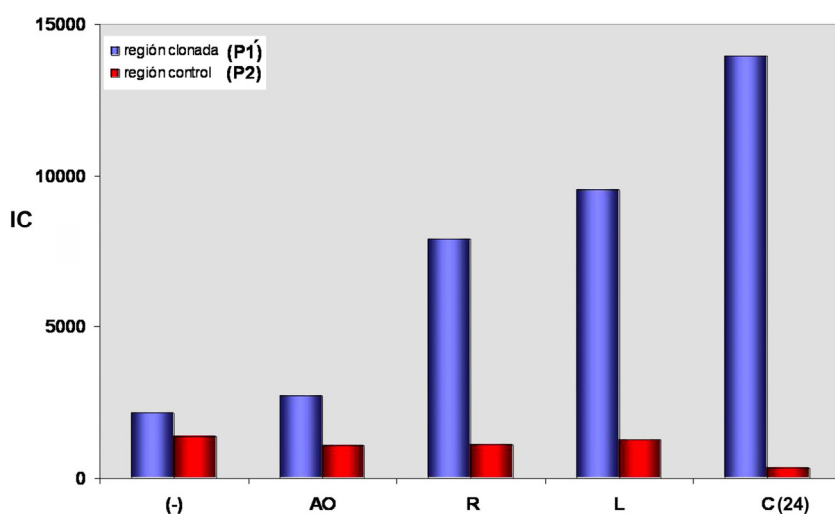


Figura 30. Unión de la proteína p6 a las secuencias clonadas en el plásmido pACYC184 en *E. coli* NF-1. Células de *E. coli* NF-1 fueron transformadas con cada uno de los plásmidos recombinantes (ver Figura 29). Tras inducir la síntesis de p6 a 37°C durante 15 minutos, se adicionó 500 µg/ml de novobiocina y 10 minutos después se entrecruzó cada cultivo con formaldehído. Los ICs obtenidos para las regiones P1' y P2 fueron, respectivamente: **L**, 9530 y 1289; **R**, 7890 y 1139; **C(24)**, 13978 y 345; **AO**, 2724 y 1103; y **(-)**, 1998 y 1292. **L**: extremo genómico izquierdo, **R**: extremo genómico derecho, **C(24)**: secuencia concatémica, **AO**: secuencia del gen que codifica la aspartato oxidasa de *E. coli*, **(-)**: región P1' sin ningún inserto, equivalente a 100 pb.

Estos resultados indican que la proteína p6 tiene distinta afinidad por fragmentos de DNA con distinta secuencia nucleotídica aún teniendo todos ellos la misma topología, por lo que la mayor afinidad de p6 por las regiones $\Phi 1$ y $\Phi 6$ en células infectadas con $\Phi 29$, podría ser explicada por la existencia de secuencias nucleotídicas que favorecen la formación del complejo nucleoproteico.

1.4.2 Unión de p6 a DNA genómico de $\Phi 29$ *in vitro*. La unión de p6 al DNA de $\Phi 29$ se ensayó *in vitro* mediante apantallamiento de la fluorescencia (ver apartado 4 de Métodos). La base de este fenómeno radica en que las

proteínas contienen fluoróforos naturales que emiten fluorescencia tras la absorción de luz de determinadas longitudes de onda. Fundamentalmente se trata de residuos de triptófano (Trp) y tirosina y, en menor medida, de fenilalanina (Lakowicz, 1983). La proteína p6 de $\Phi 29$ presenta un único residuo de Trp en posición 46 (la secuencia de p6 aparece en el capítulo 2, Figura 41) que posibilita estudios de fluorescencia. El espectro de fluorescencia intrínseca del Trp de la proteína p6 mostró su máximo a 355 nm (ver Figura 31, puntos azules) indicando que el residuo aromático se encuentra accesible al solvente, ya que de no ser así se esperarían desplazamientos del máximo hacia 330 nm. La unión de la proteína p6 al dsDNA provoca una disminución cuantificable (apantallamiento) en la fluorescencia emitida por la misma (Figura 31, puntos rojos), fenómeno que se traduce en una reducción del área del espectro en presencia de dsDNA, pero sin que se altere la posición del máximo de emisión.

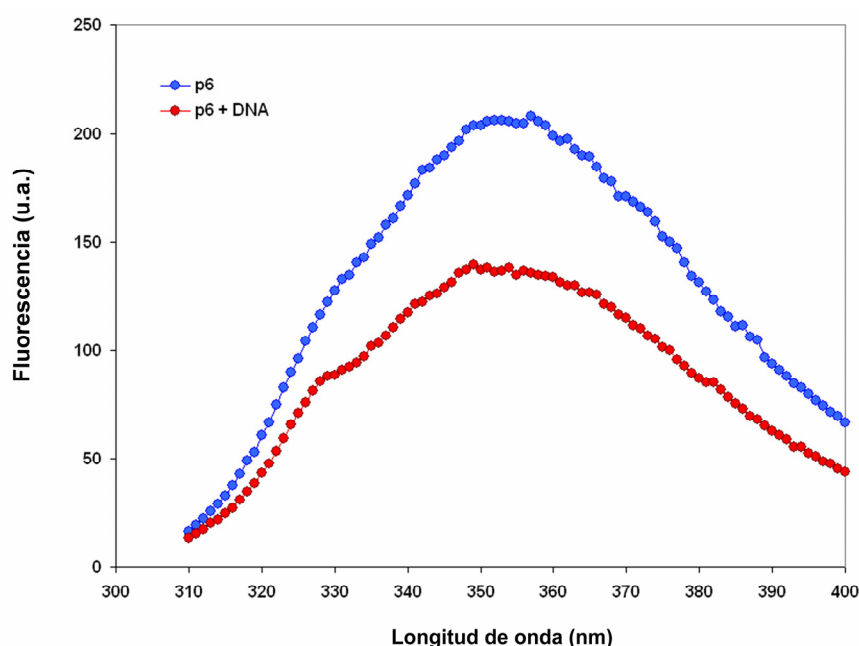


Figura 31: Espectro de emisión de fluorescencia del triptófano de la proteína p6 en presencia y ausencia de DNA. El barrido de longitudes de onda se llevó a cabo a 15°C con 2 μ M p6 y 20 μ M (en pb) DNA genómico de $\Phi 29$, en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM y $MgCl_2$ 10 mM. Los espectros se procesaron para corregir la emisión residual del tampón de ensayo y la absorción de luz por parte del DNA. nm: nanómetros. u.a.: unidades arbitrarias.

El apantallamiento de la fluorescencia debido a la unión de p6 al DNA se optimizó estudiando el efecto de varios parámetros en la interacción, como la temperatura (Figura 32) y las concentraciones de $MgCl_2$ (Figura 33) y NaCl (Figura 34). En los tres casos, se utilizó una concentración fija de p6 de 2 μ M y

de 20 μM (en pb) de DNA genómico viral, así como una muestra control de proteína sola. En estas condiciones, la proteína p6 puede llegar a ser capaz de saturar todos los sitios de unión del DNA genómico de $\Phi 29$ (resultados no mostrados). La Figura 32A muestra como la proteína p6 está unida al DNA a 15°C, situación que provoca que la emisión de fluorescencia sea menor que la emitida por la proteína libre a la misma temperatura. A medida que aumenta la temperatura, se aprecia como a partir de 20°C se produce un incremento de la emisión de fluorescencia inicialmente apantallada, indicando que la proteína comienza a soltarse del DNA. El proceso termina aproximadamente a los 34°C, cuando la emisión de fluorescencia solapa con la emisión de la proteína libre, indicando la disociación completa del nucleocomplejo. La emisión de fluorescencia de la proteína libre disminuye a media que aumenta la temperatura en el rango analizado, fenómeno conocido como “apantallamiento térmico”. Como esta situación también ocurre en presencia de DNA, los valores de emisión de la proteína en presencia de DNA se corrigieron con los de la proteína sola. Al mínimo valor de apantallamiento (equivalente a la máxima concentración de proteína libre) se le atribuyó el valor de 100% a partir del cual se normalizaron el resto de los datos (Figura 32B).

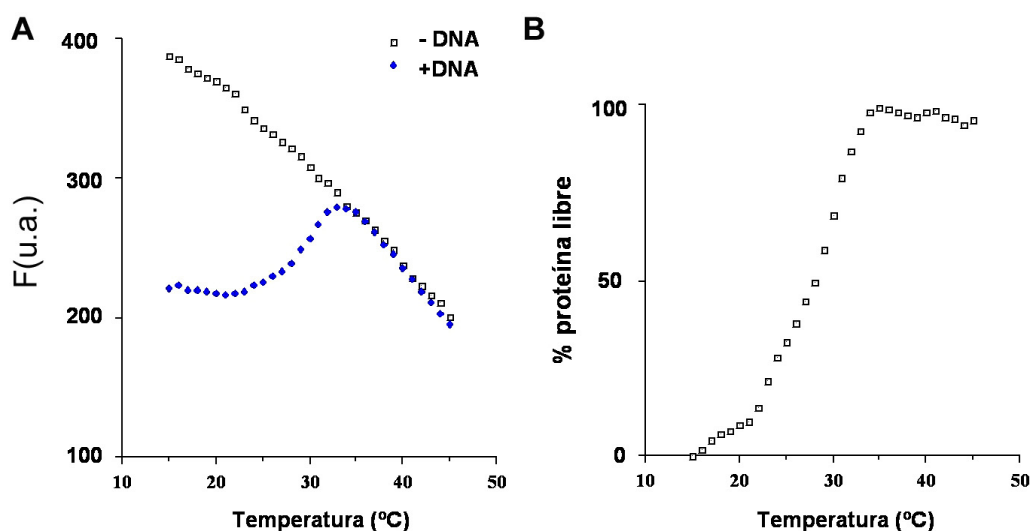


Figura 32: Efecto de la temperatura en la interacción p6-DNA. (A) Emisión de fluorescencia de la proteína p6 (F) en función de la temperatura. (B) Porcentaje de proteína libre en función de la temperatura. u.a.: unidades arbitrarias.

El apantallamiento térmico sufrido por la proteína libre es ligeramente distinto al experimentado por la proteína en presencia del DNA, fenómeno que se traduce en una pequeña pendiente residual hasta aproximadamente los

20°C (Figura 32B). Dentro del intervalo de temperatura analizado que permite la interacción p6-DNA se decidió fijar la temperatura en 15°C para los experimentos que se muestran a continuación. La Figura 33A muestra el efecto de la concentración de magnesio y pone de manifiesto la necesidad del metal para la formación del complejo p6-DNA. En ausencia de magnesio la emisión de fluorescencia de la proteína en presencia de DNA es la misma que en la muestra con proteína sola, indicando que la proteína no se encuentra unida a DNA. A medida que se fue incrementando la concentración de metal, la proteína se fue uniendo al DNA hasta saturarlo de forma completa, fenómeno que ocurrió a partir de 6 mM. Para eliminar el efecto de dilución debida a la adición de MgCl_2 se restaron a los valores de emisión de fluorescencia de la proteína libre los de emisión de la proteína en presencia de DNA (Figura 33B). De la misma forma que, en el caso anterior, los datos se expresaron en forma de porcentaje, en este caso de proteína unida al DNA. El magnesio podría actuar permitiendo que la estructura del DNA alcanzase la distorsión necesaria para formar el complejo con la proteína p6, apantallando las cargas de los grupos fosfato, explicándose así la dependencia del metal divalente en la interacción p6-DNA. Para los subsiguientes experimentos se eligió una concentración de 10 mM MgCl_2 .

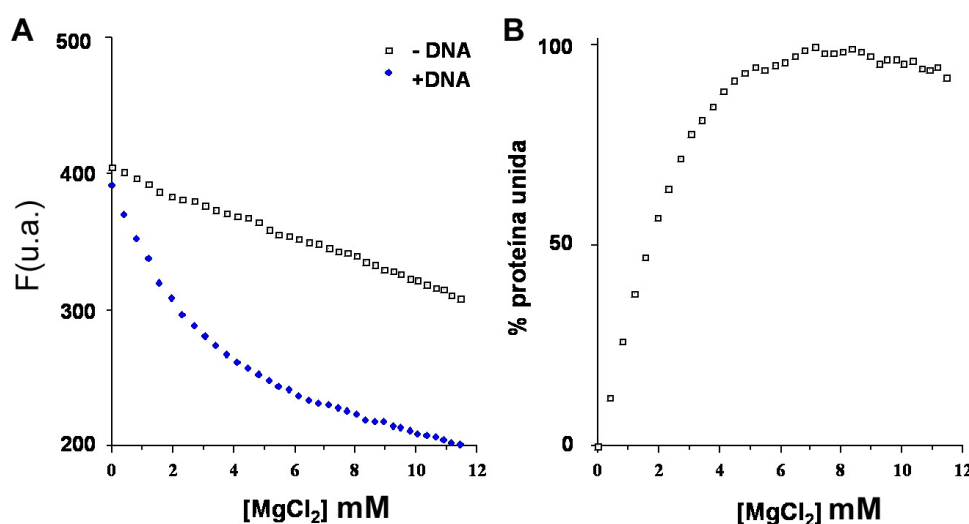


Figura 33: Efecto de la concentración de MgCl_2 en la interacción p6-DNA. (A) Emisión de fluorescencia de la proteína p6 (F) en función de la concentración de MgCl_2 . (B) Porcentaje de proteína libre en función de la concentración de MgCl_2 . u.a.: unidades arbitrarias.

Finalmente se estudió el efecto de la fuerza iónica del medio en la interacción p6-DNA. Como se puede ver en la Figura 34A, en ausencia de

NaCl la proteína p6 se encuentra unida al DNA genómico, siendo a partir de 50 mM cuando empezó a apreciarse el incremento en la emisión de fluorescencia de la proteína, indicando el comienzo del desensamblaje del nucleocomplejo. A partir de 150 mM prácticamente la totalidad de la proteína se encontró libre. De nuevo, para corregir el efecto de dilución, se restaron a los valores de emisión de la proteína sola, los de la proteína en presencia de DNA (Figura 34B). Los resultados se expresaron en forma de porcentaje de proteína unida al DNA. Se eligió una concentración de NaCl de 50 mM para los experimentos posteriores.

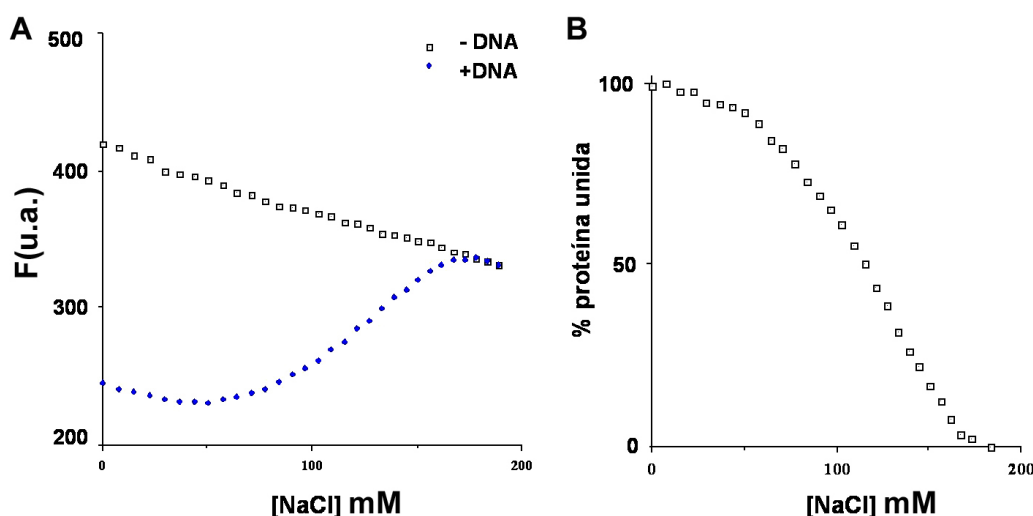


Figura 34: Efecto de la concentración de NaCl en la interacción p6-DNA. (A) Emisión de fluorescencia de la proteína p6 (F) en función de la concentración de NaCl. (B) Porcentaje de proteína libre en función de la concentración de NaCl. U.a.: unidades arbitrarias.

1.4.3 Unión de la proteína p6 a secuencias de DNA de $\Phi 29$ *in vitro*.

Se ensayó la unión de la proteína p6, en las condiciones de temperatura, concentración de $MgCl_2$ y de NaCl fijadas en el subapartado anterior, a las seis secuencias amplificadas incluidas en las seis regiones del DNA de $\Phi 29$, $\Phi 1$ - $\Phi 6$ (ver Figura 19), analizadas *in vivo* mediante X-ChIP en los apartados 1.1, 1.2 y 1.3 de este capítulo. Es conveniente recordar que las mediciones de unión de p6 *in vitro* corresponden a las secuencias amplificadas (~300 pb, señaladas en negro en la Figura 19), mientras que en los ensayos *in vivo* corresponden a toda la región de DNA inmunoprecipitada (~1200 pb, señalada en gris en la Figura 19). De esta forma, los datos *in vivo* e *in vitro*, aunque correlacionados, no son directamente comparables. Por esta razón, para evitar cualquier confusión, los fragmentos del DNA de $\Phi 29$ amplificados se denominaron de acuerdo a sus coordenadas medias (en Kb) de

posicionamiento en el genoma del fago: **5.1** para la región $\Phi 2$, **7.4** para la región $\Phi 3$, **9.7** para la región $\Phi 4$ y **11.7** para la región $\Phi 5$. **L** y **R** corresponden a los extremos izquierdo y derecho, regiones $\Phi 1$ y $\Phi 6$, respectivamente. Para determinar la constante de unión efectiva (K_{eff}) por los distintos fragmentos de DNA, se realizaron experimentos de titulación directa (Alma *et al.*, 1983) en los que cantidades crecientes de proteína p6 se adicionaron a 20 μM (en pb) de cada una de las seis secuencias, L, 5.1, 7.4, 9.7, 11.7 y R, como se muestra en la Figura 35. La línea recta corresponde a los valores de fluorescencia emitida por la proteína libre. A baja concentración de proteína, los valores de emisión de fluorescencia solapan con los de la proteína libre (Figura 35A). A una determinada concentración, entre 0.7 y 1.7 μM , la proteína p6 comienza a unirse al DNA y la emisión de fluorescencia se va apantallando, lo que provoca una caída en la pendiente. Finalmente, cuando el DNA se satura de proteína, se recupera la pendiente inicial correspondiente a los valores de emisión de la proteína libre. La Figura 35A muestra que la mayor afinidad de la proteína p6 es por los fragmentos R y L: p6 comienza a unirse a estos DNAs a las concentraciones más bajas, la pendiente durante el intervalo de unión es la más baja y la saturación es rápidamente alcanzada (ver ampliación en la gráfica de la Figura 35A). A continuación, las mayores afinidades se registraron para los fragmentos 9.7, 7.4 y 11.7, fragmento este último únicamente saturable a altas concentraciones de p6. Finalmente, la afinidad más baja se registró por el fragmento 5.1 que no alcanzó la saturación incluso a la concentración más alta de proteína ensayada. Los valores de fluorescencia obtenidos para cada uno de los fragmentos fueron ajustados mediante un algoritmo de iteración desarrollado en nuestro laboratorio (Soengas *et al.*, 1994), con la intención de calcular las K_{eff} s para cada secuencia de DNA (ver apartado 4 de Métodos). Para poder realizar el proceso de ajuste es necesario conocer el valor del apantallamiento máximo de la fluorescencia de la proteína p6 ($Q_{\text{max}} = 0.84$), la constante de emisión de fluorescencia de la proteína libre ($f_A = 290 \mu\text{M}^{-1}$) (González-Huici *et al.*, 2004c) y el número de nucleótidos del DNA cubiertos por monómero de proteína p6 ($n=12$, Serrano *et al.*, 1990). Los valores así obtenidos para las K_{eff} s (en M^{-1}) fueron los siguientes; **L**: 13.6×10^5 , **5.1**: 4.0×10^5 , **7.4**: 8.0×10^5 , **9.7**: 10.0×10^5 , **11.7**: 6.0×10^5 y **R**: 12.4×10^5 . También se determinaron los valores de las K_{eff} gráficamente (Figura 35B): en una

representación de la fracción de saturación (θ) frente la concentración de proteína libre (la cual se determina a partir de los datos de titulación directa), la inversa de $[p6]_{\text{libre}}$ cuando el DNA está hemisaturado de proteína corresponde al valor de la K_{eff} . Los valores que así se obtuvieron (**L**: 13.5×10^5 , **5.1**: 4.0×10^5 , **7.4**: 8.9×10^5 , **9.7**: 10.4×10^5 , **11.7**: 6.7×10^5 y **R**: 12.5×10^5), fueron prácticamente idénticos a los obtenidos mediante iteración.

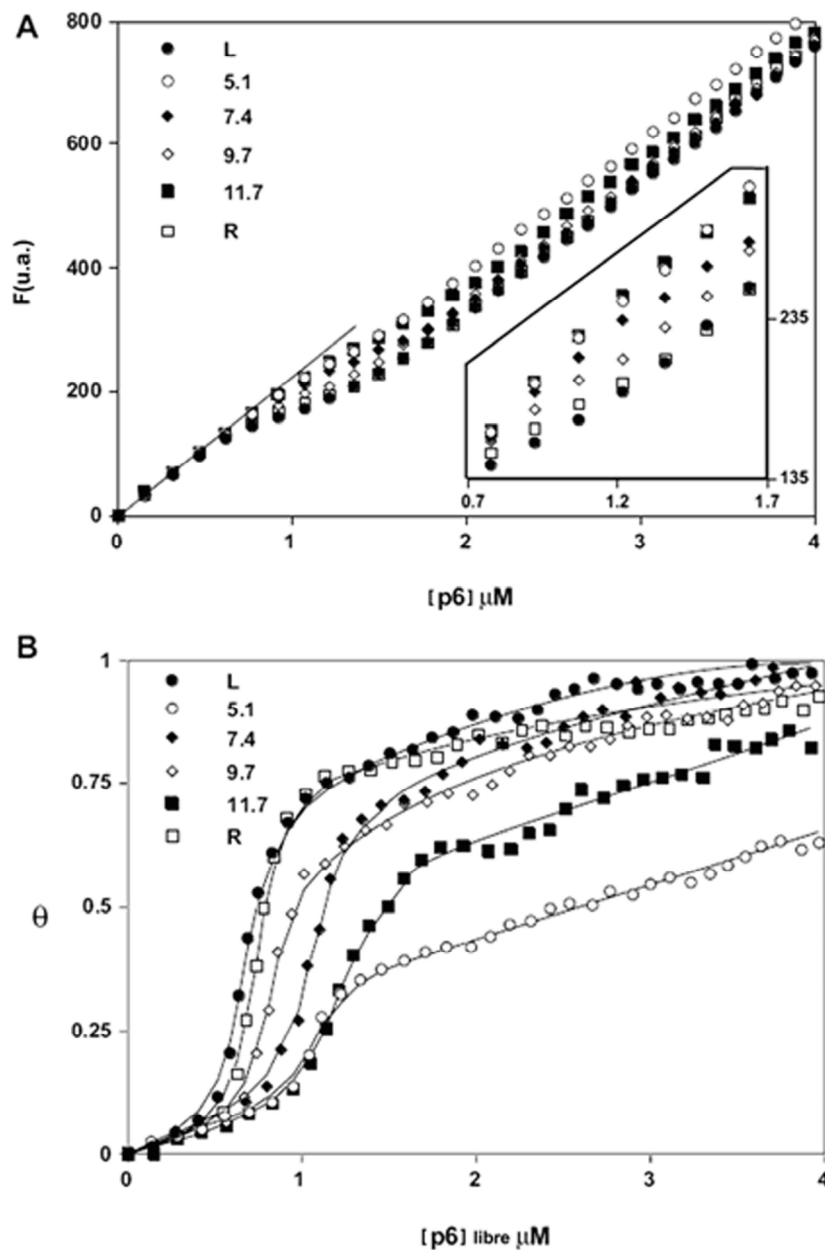


Figura 35: Medida de la unión de la proteína p6 a secuencias de DNA de $\Phi 29$ mediante apantallamiento de la fluorescencia. (A) Titulación directa de los siguientes fragmentos del DNA de $\Phi 29$: **L** (259 pb), **5.1** (363 pb), **7.4** (237 pb), **9.7** (313 pb), **11.7** (212 pb) y **R** (298 pb). **L** y **R** corresponden a los extremos genómicos izquierdo y derecho, respectivamente; 5.1-11.7 corresponden a las coordenadas genómicas de cada una de las secuencias internas (mostradas en negro en la Figura 19). La proteína p6 se fue adicionando a 20 μM de DNA (en pb). La emisión de fluorescencia se midió de forma continua y se representa en unidades arbitrarias (u.a.) frente a la concentración de p6 adicionada. **(B)** Representación de la fracción de saturación (θ) para cada fragmento de DNA frente a la concentración de proteína p6 libre. Gráfica elaborada en colaboración con Víctor González-Huici.

Aunque las diferencias en la unión de p6 por las distintas regiones del DNA genómico *in vitro* son menos pronunciadas, cualitativamente son análogas a las encontradas *in vivo*, especialmente en términos de comparación de los extremos genómicos frente a las regiones internas del DNA viral, existiendo correlación entre los datos obtenidos *in vivo* e *in vitro*. El hecho de que la preferencia de unión de p6 por las distintas regiones se mantenga en presencia de novobiocina (Figura 23) así como en los ensayos *in vitro*, sugiere fuertemente que las diferencias de afinidad de p6 se deben a la secuencia nucleotídica de las distintas regiones, más que a la presencia o existencia de distintos dominios topológicos en el genoma viral.

1.4.4 Unión de la proteína p6 a DNA con secuencias concatémicas *in vitro*. Una de las propiedades estructurales más importantes del DNA es la curvabilidad (Travers, 1991). La curvabilidad es un determinante fundamental en el posicionamiento rotacional de los nucleosomas y un modulador de la afinidad en interacciones proteína-DNA, como es el caso de la proteína CRP y su operador (Gartenberg y Crothers, 1988). En ambos sistemas se han obtenido valores experimentales de curvabilidad cualitativamente similares que evalúan la curvabilidad como la tendencia local del surco menor del DNA a cerrarse o abrirse en cada posible dinucleótido y/o trinucleótido, desarrollándose algoritmos que la cuantifican. En la Figura 36 se representa esta tendencia local del surco menor del DNA a abrirse (valores positivos) o a estrecharse (valores negativos) a lo largo del extremo genómico izquierdo de $\Phi 29$ (Serrano *et al.*, 1989), usando valores obtenidos a partir de un algoritmo desarrollado para trinucleótidos en DNA nucleosomal (Satchwell *et al.*, 1986). Las secuencias curvables presuntamente significativas para la unión de p6 al DNA, se localizaron teniendo en cuenta la alternancia de máximos y mínimos con la misma periodicidad con que los monómeros de p6 se unen a DNA (12 pb, Serrano *et al.*, 1990), coloreados de naranja o sombreados en la Figura 36. La zona comprendida entre las posiciones 35 y 58 (en color naranja) no sólo es la que mejor cumple las predicciones teóricas de curvabilidad, sino que solapa con la región, identificada por delección, que contiene sitios de unión preferente de p6 (posiciones 46-68) (Serrano *et al.*, 1989). Por esta razón se eligieron 24 pb (en

color verde) para construir un concatémoro de doce repeticiones de esta secuencia, denominado C(24) (empleada en el apartado 1.4.1), por el que la proteína p6 mostró mayor afinidad que por los extremos genómicos, tanto *in vitro* (Serrano *et al.*, 1990) como *in vivo* (Figura 30). Por tanto, la unión preferencial de la proteína p6 puede ser justificada por la presencia de secuencias con una curvabilidad anisotrópica cada 12 pb que favorezca la formación del complejo nucleoproteico (Serrano *et al.*, 1989).

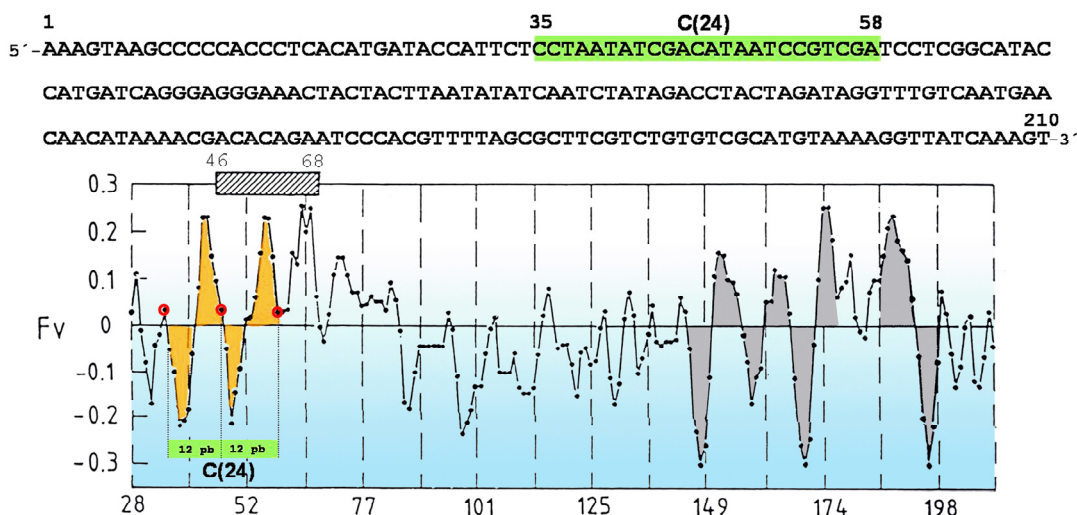


Figura 36: Predicción de curvabilidad cada 12 pb en el origen de replicación izquierdo del DNA de $\Phi 29$. Se representan las medias de las frecuencias de localización preferente (F_v) (Satchwell *et al.*, 1986) de cada tres nucleótidos solapantes a lo largo del extremo izquierdo. Los valores positivos indican preferencia de la secuencia de DNA por ensanchar su surco menor, y los negativos, tendencia por estrecharlo. La secuencia terminal se ha dividido con líneas discontinuas en regiones de 12 pb que contienen sitios de contacto de p6 previamente descritos (región 46-68) (Serrano *et al.*, 1989). Las regiones coloreadas (naranja y gris) delimitan regiones del DNA donde se alternan máximos y mínimos cada ~6 pb, de forma que la curvabilidad tenga una periodicidad de ~12 pb. Son, por tanto, regiones que teóricamente favorecen la formación del nucleocomplejo. En verde se muestra la secuencia de 24 pares de bases elegida para elaborar el concatémoro denominado C(24); su predicción de curvabilidad se ha coloreado en naranja. Figura adaptada de Serrano *et al.*, 1989.

Para dar mayor peso experimental a esta hipótesis se decidió analizar la influencia del cambio de fase en la predicción de curvabilidad de la secuencia del DNA en la unión de p6. La proteína debería unirse peor a concatémoros cuya alternancia de máximos y mínimos de curvabilidad tenga una fase distinta a cada ~6 pb. Así, a partir de la secuencia C(24), se diseñaron varias secuencias concatéméricas cuya composición se detalla en la Figura 37. La construcción de estas secuencias se describe en el apartado 5.2 de Métodos. Para cada una de estas secuencias concatéméricas se representó la predicción de curvabilidad usando el mismo algoritmo desarrollado por Satchwell *et al.* (1986) y empleado previamente en la representación de la

Figura 36. Para ello se utilizó el servidor Web “plot.it®”, herramienta bioinformática que permite el cálculo de variables físico-químicas del DNA y representarlas en función de la secuencia nucleotídica (<http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna>).

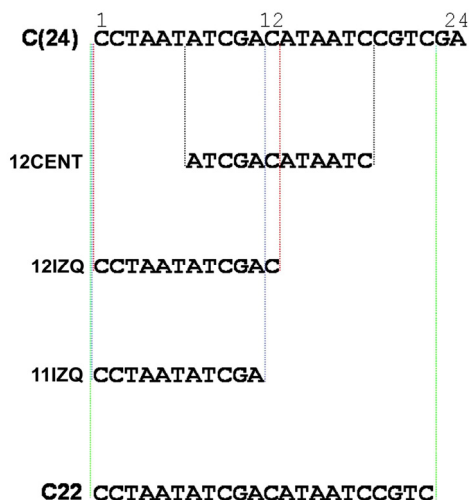


Figura 37: Secuencia de C(24) y concatémicos derivados.

La Figura 38 muestra que la predicción de curvabilidad obtenida con este programa para C(24) (ver figura 35A) es básicamente la misma que la obtenida en la Figura 36, presentando máximos y mínimos alternados cada ~6 pb (zonas coloreadas de gris). El servidor “plot.it®” genera las predicciones usando una escala arbitraria de valores entre 0 y 10 que difiere de los valores que aparecen en la Figura 36, por lo que una vez comprobada la reproducibilidad del patrón de curvabilidad de C(24), en cuanto a alternancia de máximos y mínimos, se procedió a utilizar esta herramienta con el resto de construcciones. Los concatémicos de 12 pb (12CENT y 12IZQ) presentan un patrón de alternancia de máximos y mínimos de curvabilidad con la misma fase que C(24) (Figura 38A, líneas rojas discontinuas), mientras que en los concatémicos de 11 y 22 pb (11IZQ y C22) el patrón de curvabilidad predicho como ideal para la unión de p6 (presente en C(24), Figura 38A), se va desfasando a medida que se avanza en la secuencia con respecto a C(24) (ver Figura 38B; el desfase se ha representado mediante triángulos verdes). Una vez determinado el patrón de curvabilidad para cada secuencia, se midió la afinidad de p6 por cada una de ellas, utilizando la técnica del apantallamiento de fluorescencia tal y como se describió en el apartado 1.4.3 (Figura 35A y B), llevando como control en paralelo la secuencia L del extremo izquierdo del DNA de Φ29.

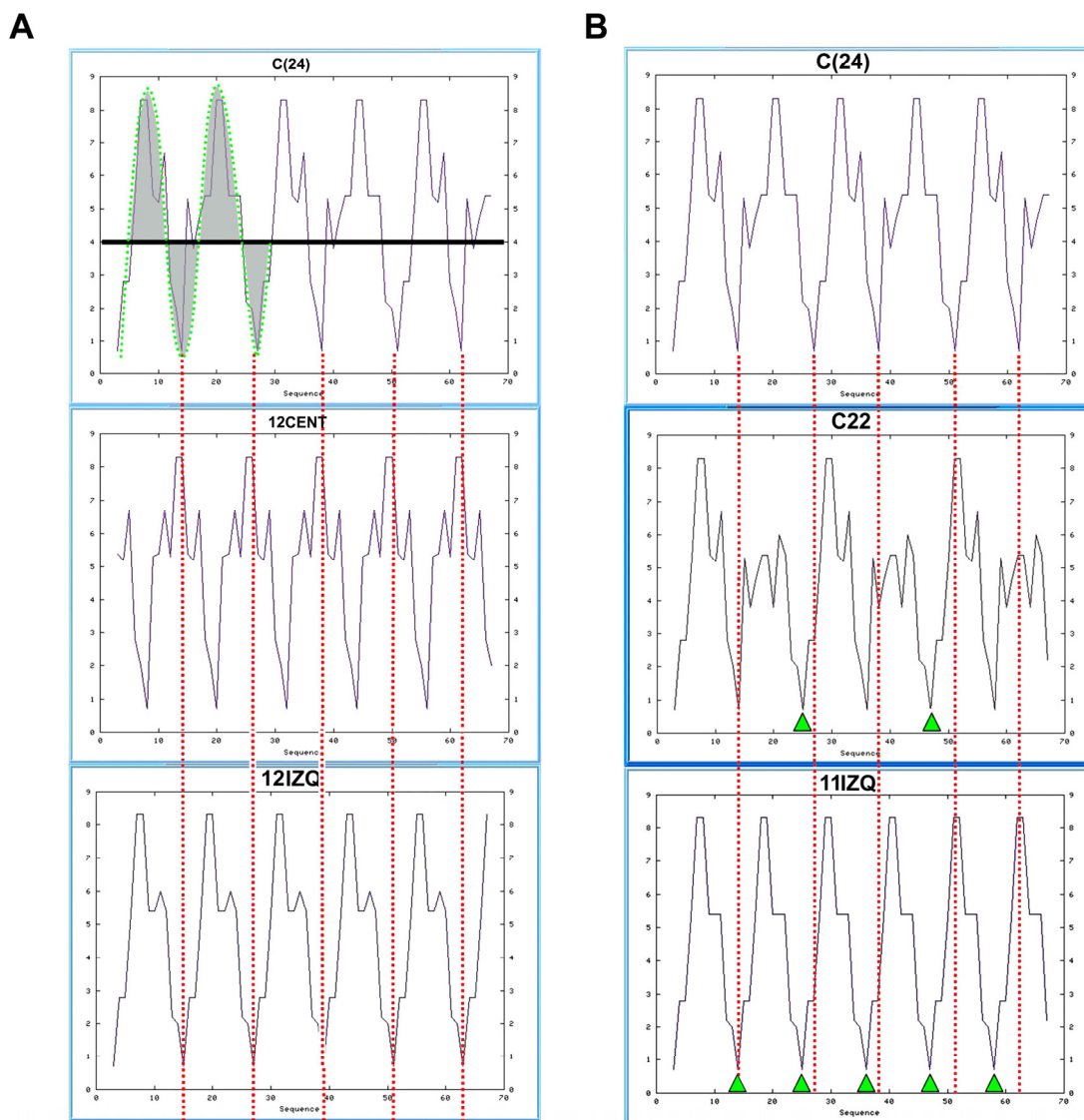


Figura 38: Predicción de curvabilidad en las secuencias concatémicas C(24), 12 CENT, 12 IZQ (A), 11IZQ y C22 (B). Se dispusieron repeticiones directas de cada una de las secuencias indicadas, hasta alcanzar una longitud de 70 nt. Se determinó la predicción de curvabilidad de las secuencias así generadas usando servidor Web “plot.it®” y el algoritmo basado en el posicionamiento de nucleótidos sobre nucleosomas de eritrocitos de pollo desarrollado por Sachwell *et al.*, 1986; se utilizó una ventana de 3 nucleótidos. La curvabilidad (de 0 a 9, en unidades arbitrarias) se representa frente a la longitud de la secuencia (hasta 70 nt).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 39 (A y B) donde se puede apreciar dos grupos de secuencias con comportamientos distintos: un primer grupo por el que p6 tiene más afinidad que por la secuencia L, constituido por C(24), 12IZQ y 12CENT, cuyos valores de K_{eff} s (en μM^{-1}) obtenidos mediante ajuste informático fueron 2.30×10^6 , 1.84×10^6 , 2.11×10^6 , respectivamente; y un segundo grupo por el que la proteína tiene una afinidad menor que por la secuencia L, constituido por 11IZQ y C22 y cuyos valores de K_{eff} s (en μM^{-1}) fueron 1.10×10^6 , 1.05×10^6 , respectivamente.

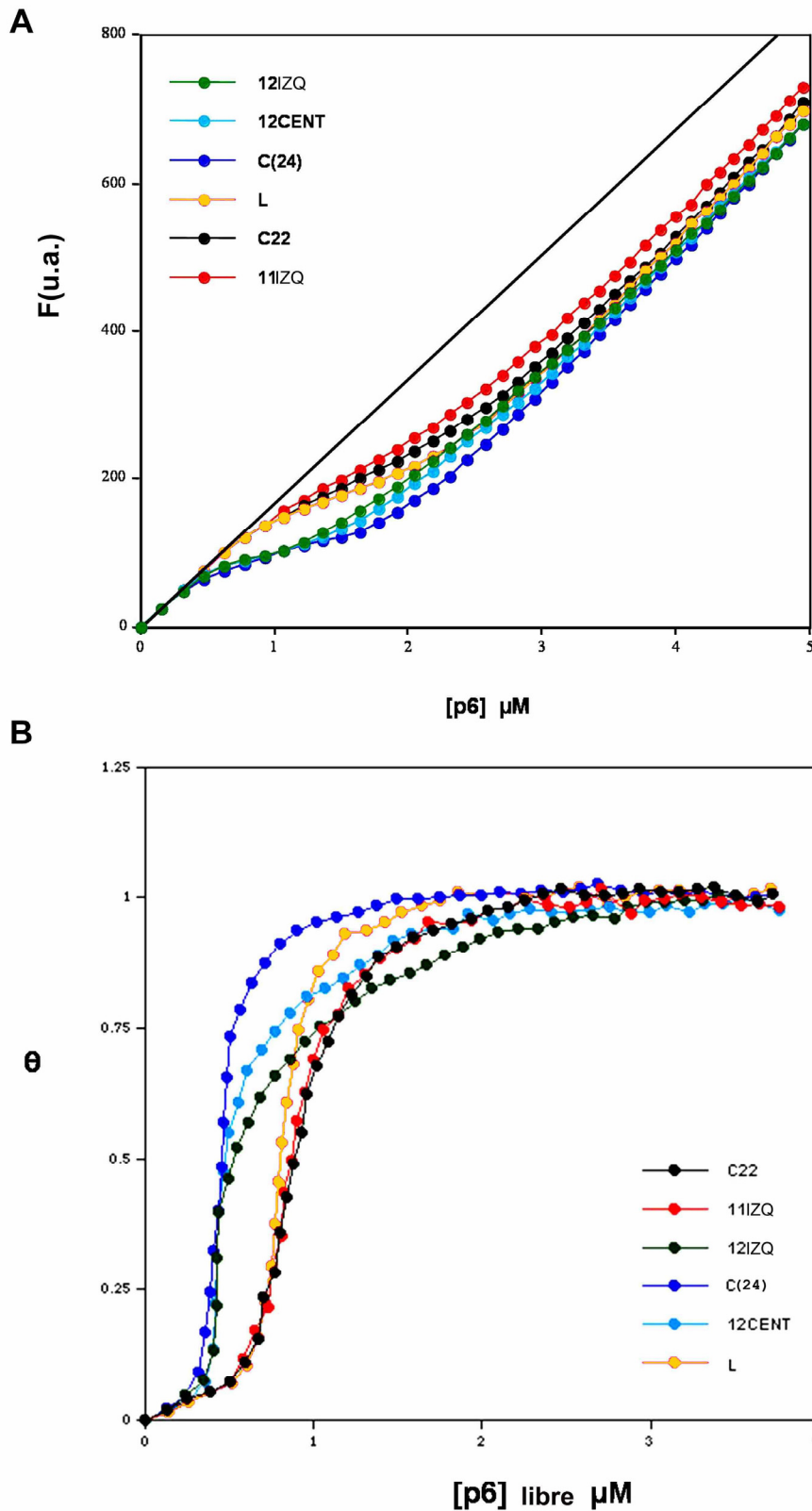


Figura 39: Medida de la unión de la proteína p6 a secuencias concatémicas mediante apantallamiento de la fluorescencia. (A) Titulación directa de las secuencias concatémicas: **C(24)** (358 pb, 12 repeticiones), **12CENT** (343 pb, 19 repeticiones), **12IZQ** (419 pb, 17 repeticiones), **11IZQ** (244 pb, 12 repeticiones) y **C22** (351 pb, 10 repeticiones). La proteína p6 se fue adicionando a 10 μM de DNA (en pb) y la emisión de fluorescencia se midió de forma continua como en la Figura 35. **(B)** Representación de la fracción de saturación (θ) para cada fragmento de DNA frente a la concentración de proteína p6 libre.

Estos resultados ponen de manifiesto que cuando se modifica la periodicidad de la secuencia concatémica C(24) hacia valores distintos de 12 ó 24, fenómeno que necesariamente implica un cambio en la periodicidad del patrón de alternancia de los máximos y mínimos de curvabilidad espaciados ~6 pb, se dificulta la unión de p6. Así, cuando los máximos y mínimos de curvabilidad están presentes alternados cada ~6 pb con la periodicidad apropiada (12 pb), se favorece la formación del complejo nucleoproteico p6-DNA. De esta forma, es lógico que estas regiones actúen como señales en la unión de p6 a los extremos del DNA viral, donde p6 estimula la iniciación de la replicación como se ha propuesto previamente (Serrano *et al.*, 1989). No obstante, es interesante señalar que los valores de K_{eff} para 11IZQ y C22 (1.11×10^6 y $1.05 \times 10^6 \mu\text{M}^{-1}$, respectivamente) son muy próximos a la K_{eff} obtenida para el extremo genómico izquierdo ($1.3 \times 10^6 \mu\text{M}^{-1}$), indicando que la afinidad de la proteína por estas secuencias repetidas es alta aunque no tengan el patrón de curvabilidad cada 12 pb. Además, p6 satura antes (a excepción de 12CENT y 12IZQ) estos DNAs altamente repetidos en comparación con las secuencias del genoma viral analizadas en el subapartado 1.4.3. Otra observación surge del análisis de las curvas de titulación obtenidas para 12CENT y 12IZQ ya que a partir del punto de hemisaturación (Figura 39B) se aprecia cómo la proteína experimenta una dificultad para terminar de saturar estas secuencias de DNA que no se detecta en las otras.

CAPÍTULO 2. UNIÓN DE LA PROTEÍNA p6 DEL BACTERIÓFAGO GA-1 AL DNA

El bacteriófago GA-1 está relacionado con $\Phi 29$ (Pečenková y Pačes, 1999) y por lo tanto, es un fago que infecta a bacterias del género *Bacillus*. Entre la familia de fagos relacionados con $\Phi 29$ (ver introducción, apartado 2.4), GA-1 es el miembro más distante. Su genoma es 1.8 Kb mayor que el de $\Phi 29$ aunque su organización estructural es muy similar: los genes tempranos están localizados en dos operones situados en ambos extremos genómicos, mientras que los genes tardíos se localizan en un único operón posicionado en la parte central del genoma viral (ver mapa genético y transcripcional; Figura 40). Sin embargo, el fago GA-1 presenta secuencias adicionales donde se pueden encontrar fases de lectura abiertas (ORFs), localizadas en ambos extremos genómicos, que podrían codificar varias proteínas para las cuales no existirían equivalentes, tanto en $\Phi 29$, como en cualquiera de los fagos relacionados caracterizados hasta el momento (Meijer *et al.*, 2001a). Estas proteínas podrían estar involucradas en aspectos desconocidos de la biología del fago así como en la interacción con la célula huésped. De hecho, el fago $\Phi 29$ infecta *B. subtilis*, mientras que GA-1 infecta a *Bacillus* sp. G1R (Arwert y Venema, 1974). El análisis del rRNA 16S de *Bacillus* sp. G1R, mostró que esta especie es un 99% idéntica a *Bacillus pumilus*, distancia evolutiva lo suficientemente pequeña como para considerarlas dos cepas distintas pertenecientes a una misma especie (Horcajadas *et al.*, 2001). Los genes de GA-1 que presentan homología con los de $\Phi 29$ son los que menos conservados están de toda la familia de fagos relacionados. De esta forma, el gen 6 de GA-1 no es una excepción a esta regla y es el que presenta menor homología e identidad con respecto a la de $\Phi 29$. El alineamiento entre la proteína p6 de GA-1 y $\Phi 29$ se muestra en la Figura 41.

La proteína p6 de GA-1 estimula la iniciación de la replicación *in vitro* (Freire *et al.*, 1996) y se une al DNA formando un complejo nucleoproteico similar al de $\Phi 29$ aunque con una periodicidad de 11 nucleótidos por monómero de proteína en vez de 12, como se había observado previamente para las proteínas de $\Phi 29$ y Nf, indicando que la estructura del nucleocomplejo en GA-1 es diferente (Freire *et al.*, 1996). Además, el superenrollamiento

inducido por la proteína p6 de GA-1 en un DNA plasmídico, en presencia de topoisomerasa I, es positivo al igual que el inducido por la proteína p6 de $\Phi 29$, aunque la cantidad de proteína necesaria para la inducción es mayor en el caso de GA-1 (Freire *et al.*, 1996).

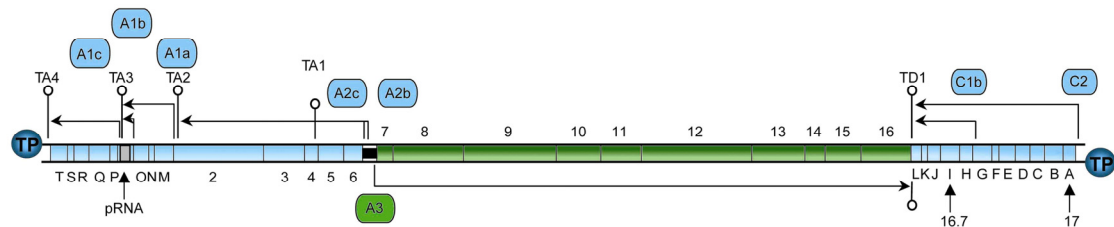


Figura 40. Mapa genético y transcripcional del DNA del bacteriófago GA-1 (grupo III, 21129 pb). Los operones tempranos se muestran en azul y el operón tardío en verde. La longitud y dirección de cada uno de los transcritos se indica mediante flechas. Los genes para los que se han encontrado homólogos en $\Phi 29$ se indican mediante números y las ORFs con letras mayúsculas. La región del DNA que codifica para el pRNA aparece coloreada en gris, y en negro la región que contiene los promotores tempranos A2b, A2c y el promotor tardío A3. También se muestran los promotores tempranos A1a, A1b, A1c, C2 y C1b; así como los terminadores transcripcionales (∇). TP: proteína terminal (círculos azules).

Estas diferencias encontradas entre los nucleocomplejos de GA-1 y $\Phi 29$ llevaron a pensar que el patrón de unión *in vivo* de la proteína p6 de GA-1 al DNA genómico viral podría presentar diferencias con respecto al descrito para el fago $\Phi 29$, así como tener una distinta dependencia del grado de superenrollamiento del DNA.

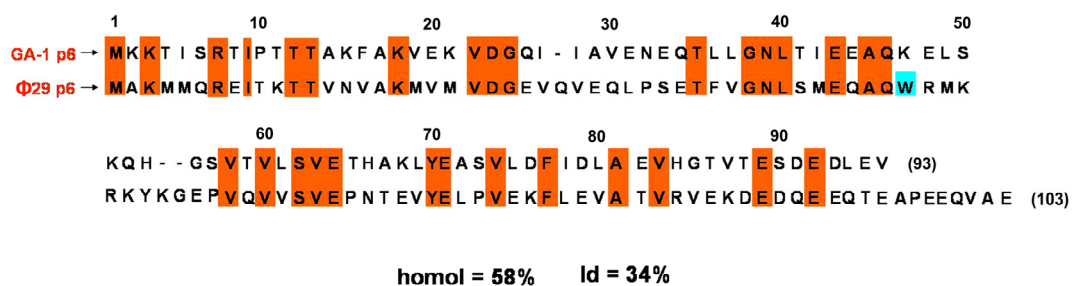


Figura 41. Secuencia de las proteínas p6 de los fagos $\Phi 29$ y GA-1. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (usando los parámetros dados por defecto, Freire *et al.*, 1996). Se muestran los porcentajes de homología (homol) e identidad (id) entre las secuencias. Los residuos idénticos entre ambas proteínas se han señalado en naranja. En azul se señala el único Trp (W) de la proteína p6 de $\Phi 29$ que no está presente en la secuencia de GA-1. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia. El número total de aminoácidos se muestra en paréntesis.

2.1 Purificación de la proteína p6 del bacteriófago GA-1.

Para estudiar la unión de la proteína p6 de GA-1 a distintas regiones del DNA genómico del fago, se decidió utilizar la técnica de X-ChIP, tal y como se

ha empleado en el capítulo anterior con el fago $\Phi 29$. Para ello fue necesario purificar la proteína p6 de GA-1 con la intención de obtener anticuerpos específicos contra ella, ya que los anticuerpos dirigidos contra la p6 de $\Phi 29$ son incapaces de reconocer la proteína heteróloga por *Western blot* (Figura 42).

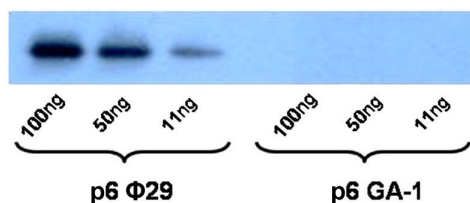


Figura 42. Especificidad de los anticuerpos dirigidos contra la proteína p6 de $\Phi 29$ en el reconocimiento de la proteína p6 de GA-1. Las cantidades indicadas de ambas proteínas fueron sometidas a SDS-PAGE en gradiente de poliacrilamida 10-20% y transferidas a membrana. El *Western blot* se reveló usando anticuerpos contra la proteína p6 de $\Phi 29$.

Así, el gen 6 de GA-1 se clonó en el plásmido pT7-4 y se expresó en *E. coli* BL21(DE3), de donde se purificó la proteína hasta la homogeneidad como se describe en el apartado 7.3 de Métodos (ver Figura 16).

2.2 Valoración de la actividad de la proteína p6 de GA-1 purificada.

La actividad de la proteína purificada se ensayó en la estimulación de la iniciación de la replicación y la inducción de superenrollamiento positivo en presencia de topoisomerasa I sobre DNA plasmídico. La Figura 43 muestra como en presencia de la proteína p6 de GA-1 purificada se estimula la formación del complejo de iniciación TP-dAMP. Los detalles experimentales se indican en el apartado 9 de Métodos.

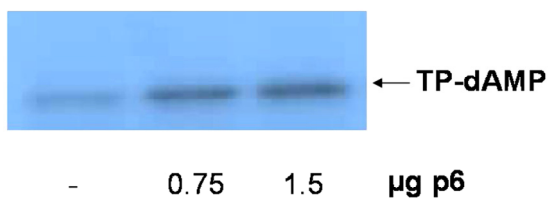


Figura 43. Activación de la iniciación de la replicación por la proteína p6 de GA-1. Se llevaron a cabo las reacciones de iniciación en presencia de las cantidades indicadas de p6. Se incubaron 500 ng de TP-DNA de GA-1 con 100 ng de TP y 250 ng de DNA polimerasa de GA-1 y $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{dATP}$ 0.25 μM (0.25 μCi). Los complejos de iniciación formados se analizaron como se indica en el apartado 9 de Métodos. La formación del complejo TP-dAMP se estimuló hasta 7 veces con 1.5 μg de p6 de GA-1.

El segundo ensayo de valoración de la actividad de la proteína purificada se basa en que p6 provoca un cambio conformacional al unirse a un DNA covalentemente cerrado, que se pone de manifiesto al tratar el complejo con topoisomerasa I (Prieto, 1986). La Figura 44 esquematiza esta situación.

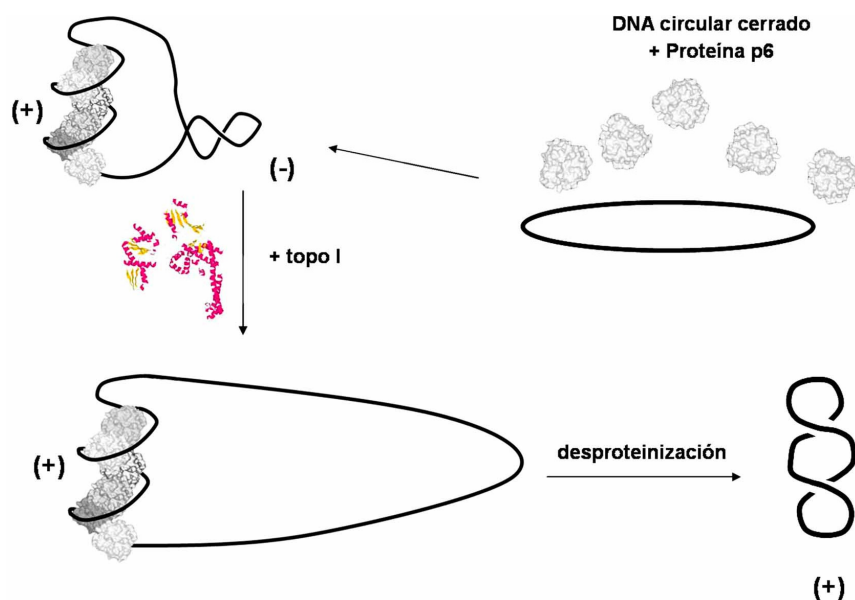


Figura 44. Esquema experimental para ensayar la inducción de supervueltas por la proteína p6 sobre DNA plasmídico. Cuando se incuba un DNA circular cerrado con proteína p6, que mantiene supervueltas positivas (+), se generan supervueltas negativas compensatorias (-) que se eliminan cuando este DNA se incuba con topoisomerasa I (topo I). Por tanto, al eliminar la proteína p6 se obtiene un DNA superenrollado positivamente.

Se utilizó el plásmido pUC19 y los topoisómeros se resolvieron por electroforesis bidimensional utilizando el agente intercalante cloroquina en la segunda dimensión (Wang *et al.*, 1983). En la primera dimensión (en ausencia de cloroquina), los topoisómeros generados tras la incubación con p6 y tratamiento con topoisomerasa I, se resuelven de forma que los más superenrollados migran más en el gel, independientemente del signo de su superenrollamiento, como se muestra en la Figura 45.

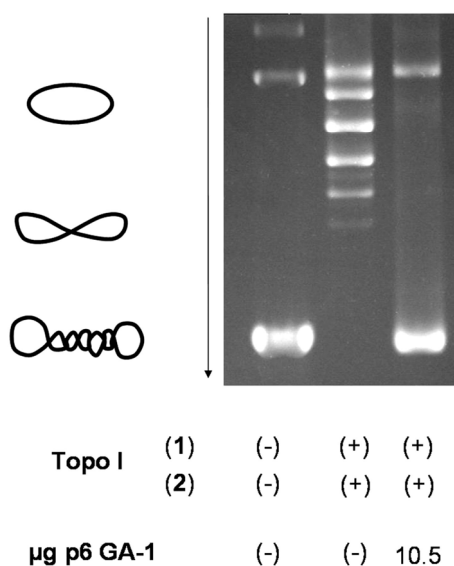


Figura 45. Inducción de supervueltas por la proteína p6 de GA-1 (electroforesis monodimensional). El plásmido pUC19 se trató durante 1 hora a temperatura ambiente con topoisomerasa I (1) para relajarlo parcialmente. A continuación se incubó con 10.5 µg de proteína p6 durante 25 min a 4°C y se trató por segunda vez con topoisomerasa I (2) durante 30 min a 30°C. Las muestras fueron sometidas a electroforesis monodimensional. A la izquierda del gel se han representado las movilidades electroforéticas de distintas formas superenrolladas o relajadas del plásmido pUC19. En presencia de 10.5 µg de proteína p6 el DNA plasmídico queda completamente superenrollado.

Durante la segunda dimensión, perpendicular a la primera, la cloroquina se intercala en el DNA y lo superenrolla positivamente distinguiéndose así los topoisómeros positivos de los negativos, ya que la cloroquina relajaría a los plásmidos con supervueltas negativas (menor movilidad electroforética) y superenrollaría más a los plásmidos con supervueltas positivas (mayor movilidad electroforética). De este modo, una mezcla de topoisómeros positiva y negativamente superenrollados forma un arco, y en un gel orientado como el de la Figura 46, los topoisómeros negativos quedan en el brazo izquierdo y los positivos en el derecho.

Como se puede apreciar en la Figura 46, la distribución de topoisómeros obtenida en presencia de la proteína p6 purificada está más superenrollada positivamente que la obtenida en su ausencia.

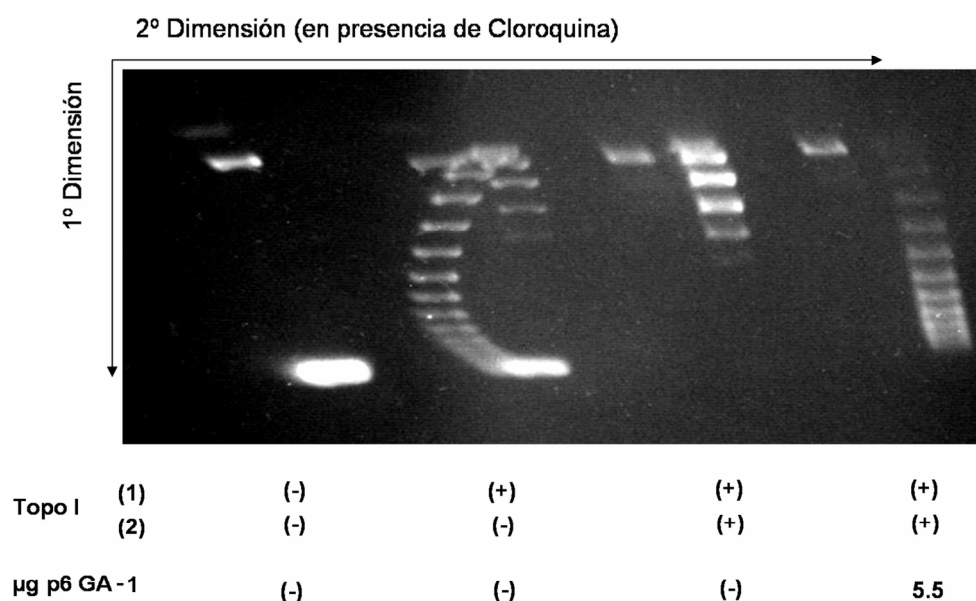


Figura 46. Inducción de supervueltas por la proteína p6 de GA-1 (electroforesis bidimensional). El plásmido pUC19 se trató durante 1 hora a temperatura ambiente con topoisomerasa I (1) para relajarlo parcialmente. A continuación se incubó con una cantidad menor de proteína p6 (5.5 µg) que en la Figura 45 (para no llegar al máximo superenrollamiento y distinguir el arco de migración), durante 25 min a 4°C y se trató por segunda vez con topoisomerasa I (2) durante 30 min a 30°C. Los topoisómeros se resolvieron en la 1ª dimensión (↓) en ausencia de cloroquina y la 2ª dimensión (→) en presencia de cloroquina.

2.3 Obtención de anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína p6 de GA-1.

Una vez comprobada la actividad de la proteína purificada, se prepararon anticuerpos para su utilización en ensayos de X-ChIP, siguiendo el protocolo clásico de inmunización, detallado en el apartado 8 de Métodos, y utilizando proteína nativa. El antisuero obtenido se ensayó primero mediante *Spot blot* (ver Figura 17) y luego por *Western blot* en células de *Bacillus* sp. G1R infectadas con el bacteriófago GA-1. Para ello, se creció *Bacillus* sp. G1R a 30°C hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml, se infectó con el fago GA-1 a una m.d.i.=10 y se tomaron alícuotas a los tiempos post-infección indicados (Figura 47). Como se puede apreciar en la Figura 47, el anticuerpo obtenido contra la proteína p6 de GA-1 resultó ser altamente específico, generando una única banda en un *Western blot* de un extracto de células infectadas. Una vez comprobada la especificidad del anticuerpo obtenido, se procedió a su ensayo en experimentos de X-ChIP.

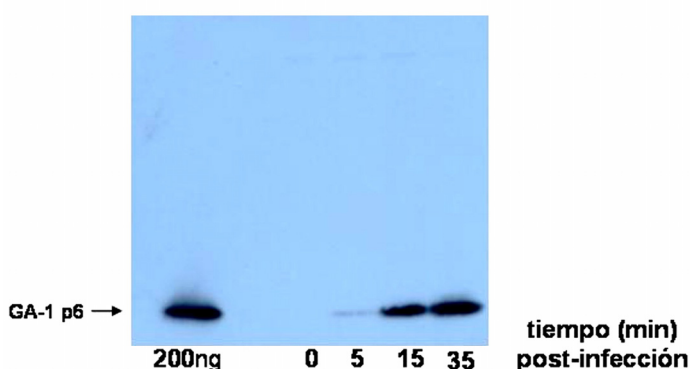


Figura 47. Síntesis de la proteína p6 del bacteriófago GA-1 en células infectadas de *Bacillus* sp. G1R. A los tiempos post-infección indicados, se tomaron alícuotas de 1.5 ml que fueron sometidas a electroforesis en gel de acrilamida en gradiente 10-20% y analizadas posteriormente por *Western-blot* con los anticuerpos obtenidos.

2.4 Unión *in vivo* de la proteína p6 de GA-1 al DNA viral y plasmídico en *Bacillus* sp. G1R y efecto del superenrollamiento en la interacción.

La unión de la proteína p6 de GA-1 a DNA *in vivo* se midió por la técnica de X-ChIP, llevándose a cabo los experimentos de forma análoga a los que se han descrito en el capítulo anterior. Las regiones del genoma del bacteriófago GA-1 seleccionadas para analizar la unión de p6 se muestran en la Figura 48.

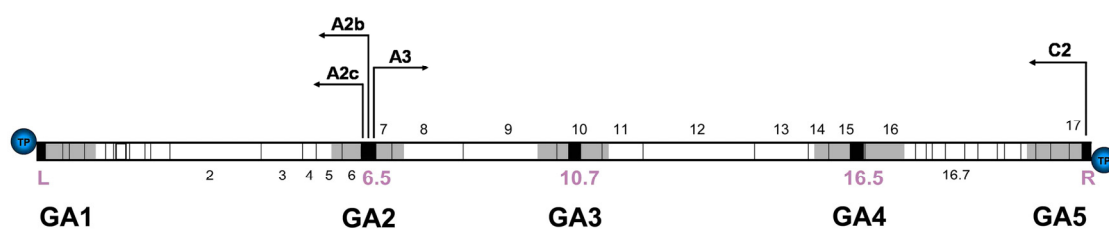


Figura 48. Localización genómica de las regiones del DNA de GA-1 analizadas para medir la unión de la proteína p6 *in vivo*. Las regiones en las que se ha estudiado la unión de p6, de ~1200 pb (~750 para los extremos genómicos), GA1-GA5, se muestran en gris. Las secuencias seleccionadas para amplificar por PCR en tiempo real, de ~300 pb, se muestran en negro y se denominan de izquierda a derecha: **L**, que contiene el origen de replicación izquierdo; **6.5**, que contiene los promotores tempranos A2b y A2c así como el promotor tardío A3; **10.7**, localizada en el gen 10; **16.5**, localizada en el gen 15 y **R**, que contiene el origen de replicación derecho y el promotor temprano C2. Los números corresponden a las coordenadas medias de posicionamiento de estas regiones en el genoma viral (en Kb). Se indican las posiciones de los genes para los cuales se ha encontrado homología con respecto a los de $\Phi 29$, numerados del 2 al 17. La proteína terminal (TP) unida covalentemente a cada extremo 5', se representa mediante círculos azules. Las flechas negras señalan los principales promotores virales: los promotores tempranos C2, A2b y A2c se transcriben hacia la izquierda y el promotor tardío A3 se transcribe hacia la derecha.

Para cada par de cebadores, se buscaron condiciones de amplificación que permitiesen la obtención de un único producto genuino mediante PCR en tiempo real (ver apartado 2 de Métodos). Las coordenadas de cada par de cebadores se especifican en la Tabla 2 (apartado 2 de Métodos). Como control, también se midió la unión de p6 a la región P1 del plásmido pPR55ow6 (ver Figura 22). Para ello, fue necesario transformar células competentes de *Bacillus* sp. G1R (ver apartado 6 de Métodos) con el plásmido pPR55ow6. De la misma forma que en el caso de $\Phi 29$, la unión de p6 se expresó en forma de IC.

Se crecieron células de *Bacillus* sp. G1R/pPR55ow6 a 30°C hasta una densidad de 10^8 células/ml y se infectaron con el bacteriófago GA-1 a m.d.i.=10. El momento en que se llevó a cabo el entrecruzamiento con formaldehído se adelantó al minuto 15 (con respecto al minuto 20 empleado con $\Phi 29$) ya que en el bacteriófago GA-1, están adelantados tanto la síntesis de DNA viral como de proteína p6, respecto a $\Phi 29$ (resultados no mostrados). De esta forma, una alícuota se entrecruzó en el minuto 15 (C), mientras otras dos alícuotas fueron tratadas con 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloramfenicol junto con 500 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina (+Nov) o ácido nalidíxico (+Nal) y entrecruzadas 10 minutos después. Como se puede apreciar en la Figura 49, el patrón de unión obtenido para la proteína p6 de GA-1 comparte similitudes con el de $\Phi 29$ ya

que la mayor unión se registró por ambos extremos genómicos, si bien las diferencias con respecto a las regiones internas fueron menores. La unión de p6 a la región P1 del DNA plasmídico fue ~8 veces menor de media, que a las regiones del DNA viral. No se registró una especial baja afinidad por la región GA2, que contiene los promotores tempranos A2b y A2c así como el promotor tardío A3, análoga a la región Φ 2 analizada en Φ 29. Sin embargo, a diferencia de lo que se detectó con Φ 29 (Figura 23), la novobiocina no aumentó significativamente la unión de la proteína p6 al DNA del fago GA-1.

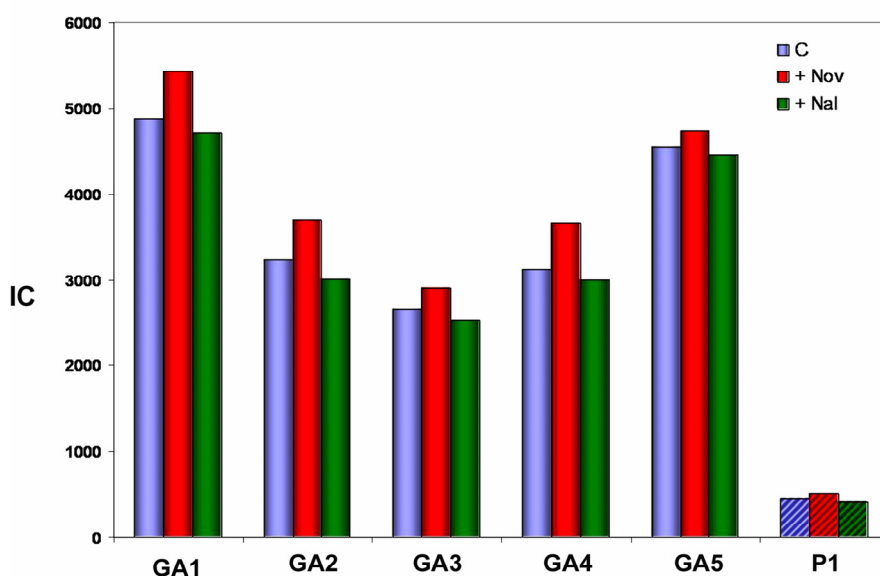


Figura 49. Unión de la proteína p6 al DNA de GA-1, al DNA plasmídico (P1) y efecto de la novobiocina y el ácido nalidixico en la unión. Células de *Bacillus* sp. G1R portadoras del plásmido pPR55ow6 fueron infectadas a 30°C con GA-1 a m.d.i.=10 y 15 minutos después una alícuota control (C) fue entrecruzada con formaldehído. Otras dos alícuotas fueron tratadas con 34 μ g/ml de cloramfenicol junto con 500 μ g/ml de novobiocina (+Nov) o ácido nalidixico (+Nal) y entrecruzadas 10 minutos después. Los valores de IC para cada región fueron (C, +Nov, +Nal); **GA1**: 4864, 5419, 4700; **GA2**: 3242, 3703, 3002; **GA3**: 2659, 2898, 2515; **GA4**: 3123, 3659, 2993; **GA5**: 4553, 4732, 4453 y **P1**: 450, 511, 420 (columnas con trama diagonal).

Para comprobar que efectivamente se estuviese inhibiendo la girasa de *Bacillus* sp. G1R, se estudió el efecto de ambos inhibidores en la replicación del DNA viral, al igual que se mostró para el fago Φ 29 en el capítulo 1 (Figura 24). Como se muestra en la Figura 50, ambos inhibidores bloquean drásticamente la replicación viral, siendo su inhibición más acentuada que la registrada en Φ 29 (Figura 24). De hecho, en presencia de novobiocina, se produce lisis celular detectable a partir de los diez minutos de incubación, ya que hay una disminución del DNA viral con respecto al tiempo.

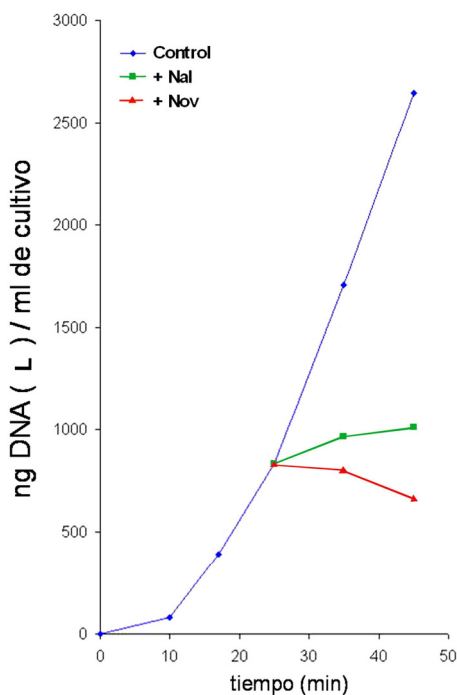


Figura 50: Efecto de la novobiocina y ácido nalidíxico en la replicación del DNA del bacteriófago GA-1. Células de *Bacillus* sp. G1R se crecieron a 30°C hasta 10^8 células/ml y fueron infectadas con GA-1 a m.d.i.=10 y 25 minutos después el cultivo se dividió en tres alícuotas: una se utilizó como control (Control) y a las otras dos se les adicionó 500 µg/ml de novobiocina (+Nov) o ácido nalidíxico (+Nal). Las alícuotas (1 ml) se tomaron a los tiempos indicados y el DNA se extrajo por fenolización y precipitación con etanol. La cantidad de DNA de GA-1 se determinó mediante PCR en tiempo real, amplificando la secuencia terminal izquierda (L). Los resultados se expresan en ng de DNA por ml de cultivo.

2.5 Unión de la proteína p6 del bacteriófago GA-1 al DNA del bacteriófago Φ29 en *B. subtilis* 110NA.

La insensibilidad mostrada por la p6 de GA-1 ante la novobiocina en *Bacillus* sp. G1R podría ser una propiedad intrínseca de la proteína, del DNA de GA-1, de ambos o incluso depender del entorno bacteriano. Para discriminar entre estas posibilidades, se decidió expresar la proteína p6 de GA-1 en el contexto intracelular de *B. subtilis* 110NA y estudiar su unión al DNA plasmídico y de Φ29. Para ello se clonó el gen 6 de GA-1 en el plásmido pPR54 donde su expresión está controlada por el promotor P_L de λ (ver apartado 5.4 de Métodos). El plásmido pPR54 es idéntico al pPR55, excepto en que contiene el gen que codifica un represor termosensible de λ (ver Figura 14), que no está presente en pPR55 (ver Figura 22), siendo la región P1 idéntica para ambos plásmidos. Esta construcción, denominada pPR54+gen6(GA-1), fue introducida en *B. subtilis* 110NA. Debido a que la expresión de la proteína p6 de GA-1 en esta construcción es dependiente de temperatura (ver Figura 51), se buscaron condiciones de inducción donde la cantidad de proteína fuese equiparable a la cantidad de proteína p6 de Φ29 producida de forma constitutiva a partir del plásmido pPR55w6. Estas condiciones se encontraron creciendo las células a 30°C hasta una densidad

de 10^8 células/ml e induciendo la expresión de p6 de GA-1 a 40°C durante 15 minutos. De esta forma, las cantidades de ambas proteínas (determinadas por *Western-blot*) son equivalentes (resultados no mostrados).

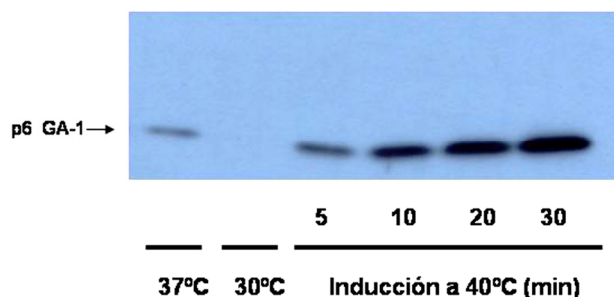


Figura 51: Expresión dependiente de temperatura de la proteína p6 de GA-1 en *B. subtilis* 110NA. Se crecieron células de 110NA portadoras del plásmido pPR54+gen6(GA-1) a 30°C hasta una densidad de 10^8 células/ml. A continuación se subió la temperatura a 40°C (tiempo 0) y se tomaron alícuotas de 1.5 ml a los tiempos indicados que fueron analizadas por *Western-blot*, tras haberlas sometido a SDS-PAGE en gradiente 10-20%. También se analizó la cantidad de proteína sintetizada al crecer las células a 37°C hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml.

Así, se pudo estudiar la unión de las dos proteínas p6, la de GA-1 y la de $\Phi 29$, al DNA plasmídico (región P1) y de $\Phi 29$ (región $\Phi 6$, extremo genómico derecho). Para ello, se crecieron las dos cepas de *B. subtilis* 110NA/pPR55w6, expresando de forma constitutiva la proteína p6 de $\Phi 29$ y 110NA/pPR54+gen6(GA-1), expresando de forma termosensible la proteína p6 de GA-1, a 30°C hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml; a continuación, en ambos casos se subió la temperatura a 40°C durante 15 minutos. Las estirpes productoras de p6 de GA-1 y $\Phi 29$ se denominarán durante el resto del Capítulo 2 de forma simplificada como 110NA/p6GA-1 y 110NA/p6 $\Phi 29$, respectivamente. Los cultivos se centrifugaron y resuspendieron en medio LB a 30°C, añadiéndose cloramfenicol (34 μ g/ml) y novobiocina (500 μ g/ml) inmediatamente antes de infectarlos con $\Phi 29$ *sus14*(1242) a m.d.i.=10. En presencia de cloramfenicol sólo penetra la parte derecha del DNA del fago, ya que la internalización completa del genoma requiere la síntesis de proteínas virales tempranas a partir del promotor C2 (ver Figura 3). La incubación con novobiocina se prolongó durante 40 minutos antes de realizar el entrecruzamiento con formaldehído. Mediante X-ChIP se midió la unión de ambas proteínas al extremo derecho de $\Phi 29$ (región $\Phi 6$, ver Figura 19), así como a la región P1 de pPR55w6 y pPR54+gen6(GA-1) (ver Figura 22), tanto en presencia como en ausencia de novobiocina. Debido a que

los ICs obtenidos para cada una de las dos proteínas p6 no son directamente comparables entre sí, ya que se han obtenido mediante anticuerpos distintos que podrían tener distinta eficiencia de inmunoprecipitación, se calcularon las relaciones IC_{+Nov}/IC_{-Nov} para cada región, lo que permite calcular el incremento que provoca la novobiocina en la unión de p6. Como se puede comprobar en la Figura 52, la novobiocina provoca un incremento de 13.3 veces en la unión para la región P1 y de 19.9 para el extremo derecho ($\Phi 6$) en el caso de la proteína p6 de $\Phi 29$. Sin embargo, para la proteína p6 de GA-1 los incrementos registrados fueron de 1.6 veces para la región P1 y de 2.3 veces para el extremo derecho ($\Phi 6$), a pesar de haberse prolongado el tiempo de incubación con novobiocina hasta 40 minutos, con respecto a la situación mostrada en el apartado 2.4 (ver Figura 49), donde las incubaciones con novobiocina se llevaron a cabo durante 10 minutos. Estos resultados confirman que la dependencia de superenrollamiento de la proteína p6 de GA-1 en su interacción con el DNA es muchísimo menor que la experimentada por la proteína p6 del bacteriófago $\Phi 29$.

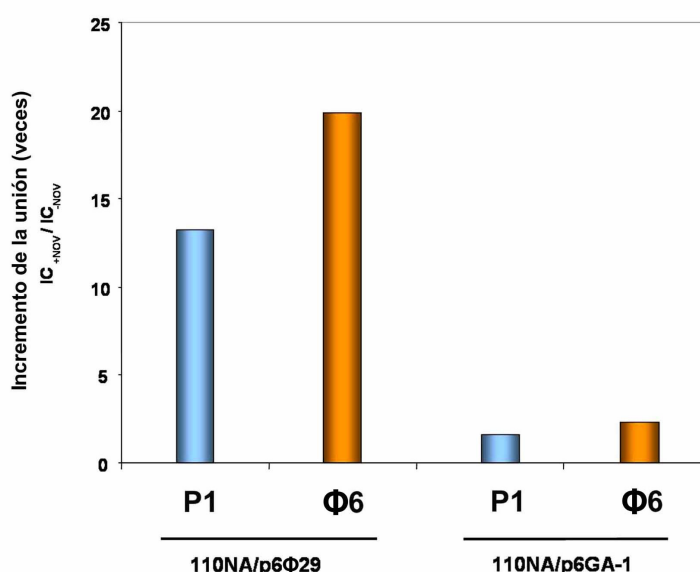


Figura 52. Unión de p6 de $\Phi 29$ y GA-1 al extremo derecho de $\Phi 29$ ($\Phi 6$) y la región P1 del DNA plasmídico. Se crecieron las estirpes 110NA/p6 $\Phi 29$ y 110NA/p6GA-1 a 30°C hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml, se subió la temperatura a 40°C durante 15 minutos, se centrifugaron las células y se resuspendieron de nuevo en medio LB a 30°C antes de añadir 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloramfenicol. De cada cultivo se tomaron dos alícuotas de 20 ml. Una de ellas permaneció como control (-Nov) y a la otra se le adicionó 500 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina (+Nov), infectándose ambas con $\Phi 29$ *sus14*(1242) a m.d.i.=10. A los 40 minutos se entrecruzaron los cultivos con formaldehído. Los valores de IC para cada región fueron (C, +Nov); $\Phi 6$: 94.2, 1874; P1: 93.6, 1243.9; para la estirpe 110NA/p6 $\Phi 29$; $\Phi 6$: 800, 1879.3; P1: 571.9, 925.6, para la estirpe 110NA/p6GA-1. El IC registrado para cada región en presencia de novobiocina se dividió entre el IC registrado en su ausencia y se representó el incremento de la unión de las proteínas p6 de $\Phi 29$ y GA-1 para cada región de DNA.

Para poder analizar la unión de la proteína p6 de GA-1 a la totalidad del genoma de $\Phi 29$ se llevó a cabo una infección de *B. subtilis* 110NA/p6GA-1 con el mutante *sus6*(626) a m.d.i.=10, tras haber inducido previamente la síntesis de la proteína p6 de GA-1 como se ha descrito. En paralelo, se infectó un cultivo con el mismo mutante de *B. subtilis* 110NA/p6 $\Phi 29$. Primero se analizó la replicación del mutante *sus6*(626) en presencia de ambas proteínas. Si bien la proteína p6 de $\Phi 29$ trans-complementa al mutante, la proteína p6 de GA-1 no es funcional en el sistema heterólogo de $\Phi 29$ (Figura 53A). La presencia de ambas p6 se detectó mediante *Western-blot* usando anticuerpos específicos para cada una de ellas (Figura 53B).

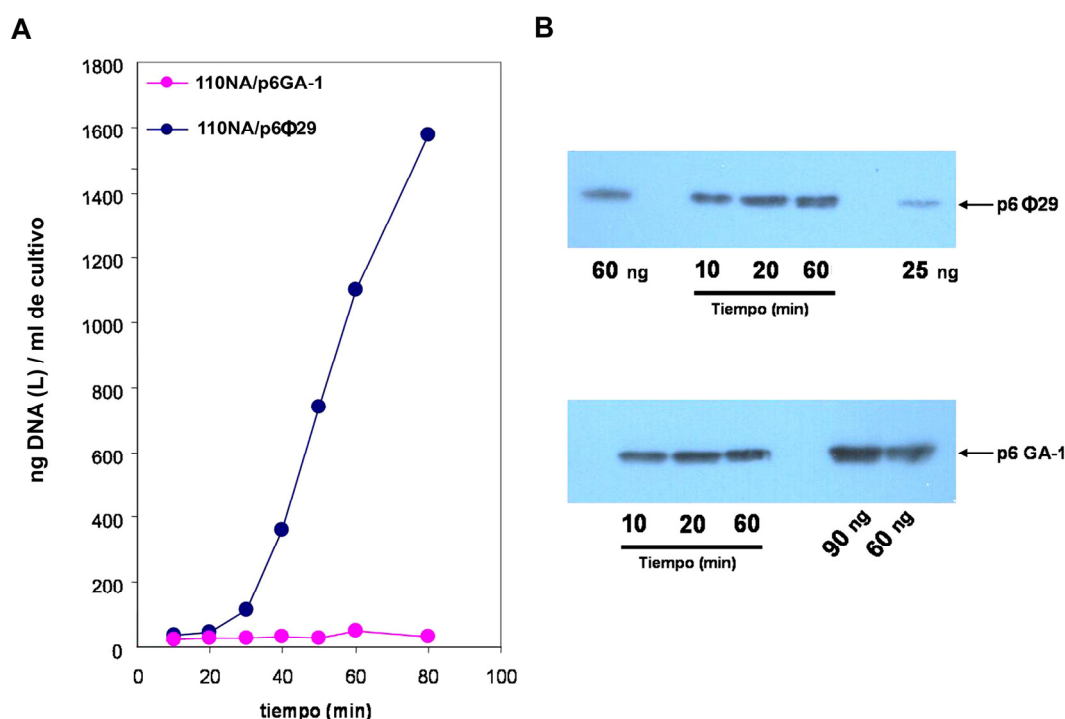


Figura 53. Replicación del mutante *sus6*(626) en las cepas de *B. subtilis* 110NA/p $\Phi 29$ y 110NA/p6GA-1. **A:** A los tiempos post-infección indicados se tomaron alícuotas de 1 ml y se extrajo el DNA viral correspondiente al extremo izquierdo (L) se cuantificó mediante PCR en tiempo real. **B:** A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 1 ml para determinar mediante *Western-blot* la cantidad de proteína p6 de los fagos $\Phi 29$ y GA-1. De esta forma se pudo comprobar que la p6 de GA-1, una vez inducida, se mantiene estable en 110NA sin sufrir degradación, al menos hasta el minuto 60 post-infección. Los films fueron densitometrados y se comprobó que ambas proteínas se encuentran en niveles equivalentes. La cantidad de marcador utilizado se expresa en nanogramos.

El entrecruzamiento con formaldehído en las dos cepas de *B. subtilis* 110NA se realizó en el minuto 20 post-infección, antes de que comenzase la replicación del DNA viral. En estas condiciones, las cantidades de DNA viral (Figura 53A) y de proteína p6 (Figura 53B) son comparables para las cepas de

110NA productoras de p6 de Φ 29 y de GA-1. Como se puede ver en la Figura 54A, la proteína p6 de Φ 29 genera el mismo patrón de unión a las regiones Φ 1- Φ 6 que se ha descrito en el capítulo 1 (Figuras 21 y 23), con la diferencia de que los valores de IC tanto en ausencia como en presencia de novobiocina, son más bajos que los descritos para el mutante *sus14*(1242) en el minuto 20 post-infección, ya que la cantidad de proteína p6 de Φ 29 sintetizada a partir del plásmido pPR55w6 de forma constitutiva es inferior a la producida en el minuto 20 post-infección por el mutante *sus14*(1242) (resultados no mostrados). Además, la proteína p6 de Φ 29 reprime el promotor temprano C2 situado en el extremo genómico viral derecho, a partir del cual se expresan proteínas que intervienen en la penetración de la parte izquierda del genoma. Por esta razón se produce un retraso en el proceso de inyección cuando se infectan células productoras de p6. Este fenómeno se refleja en que el IC de la región Φ 1 es menor al de región Φ 6 (cuando la afinidad de p6 es mayor por la región Φ 1 que por la región Φ 6, Figuras 21 y 23), indicando que muchos fagos no han completado el proceso de inyección en el instante post-infección analizado. En ausencia de novobiocina se registró una mayor unión al DNA plasmídico (región P1) con respecto a las regiones Φ 1- Φ 6 (a diferencia de los resultados mostrados en la Figura 23). Esta circunstancia se debe probablemente a que al no haberse completado el proceso de inyección, la topología del DNA viral infectante es distinta a la que tiene el DNA cuando se ha internalizado de forma completa: el DNA viral se encontraría más negativamente superenrollado que el DNA plasmídico, por lo que la unión de p6 estaría más favorecida a este último.

En cambio, la proteína p6 de GA-1 (ver Figura 54B), aunque es capaz de unirse a todas las regiones analizadas del mutante *sus6*(626), genera un patrón distinto al presentado por la proteína p6 de Φ 29 y distinto a su vez al que genera sobre el DNA de GA-1, donde la mayor unión se registra por ambos extremos genómicos virales (regiones GA1 y GA5) mientras que es más baja en regiones internas (ver Figura 49), al igual que ocurre con la proteína p6 de Φ 29 sobre el DNA de Φ 29 (ver Figura 21). Probablemente la proteína p6 de GA-1 no reprima *in vivo* el promotor C2 de Φ 29, o si lo hace sea en menor medida que la represión ejercida por la proteína p6 de Φ 29, ya que

las diferencias entre los ICs para las regiones $\Phi 1$ y $\Phi 6$ (Figura 54B) son menores que las registradas en la Figura 54A.

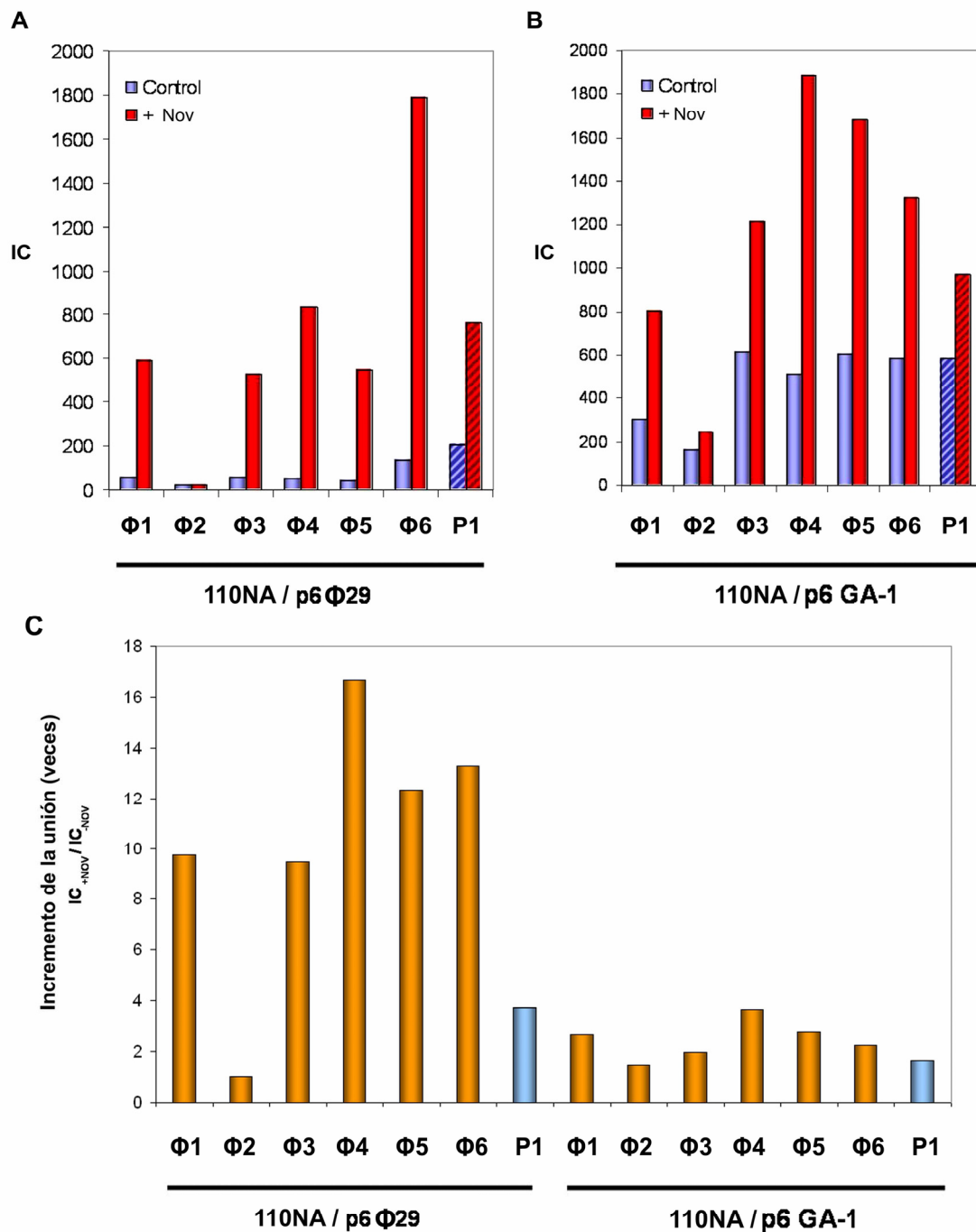


Figura 54. Unión de las proteínas p6 de $\Phi 29$ y de GA-1 al DNA genómico de $\Phi 29$ *sus6(626)* en *B. subtilis* 110NA. Se muestran la unión de la proteína p6 en presencia y ausencia de novobiocina (Control, +Nov) para cada una de las regiones genómicas de $\Phi 29$. **A:** X-ChIP realizado en 110NA/p6 $\Phi 29$ con anticuerpos dirigidos contra la proteína p6 de $\Phi 29$; los ICs fueron para cada región, $\Phi 1$: 60.5, 590; $\Phi 2$: 18.5, 18.6; $\Phi 3$: 55.8, 527.7; $\Phi 4$: 50.1, 834.4; $\Phi 5$: 44.4, 548.5; $\Phi 6$: 134.9, 1791 y P1: 205.9, 767.5. **B:** X-ChIP realizado en 110NA/p6GA-1 con anticuerpos dirigidos contra la proteína p6 de GA-1; los ICs para cada región fueron, $\Phi 1$: 303.7, 805.9; $\Phi 2$: 162.9, 245.3; $\Phi 3$: 613.4, 1216; $\Phi 4$: 515.7, 1885.5; $\Phi 5$: 607.3, 1681.8; $\Phi 6$: 585.4, 1325 y P1: 586.3, 975. **C:** Incremento, en veces, de la unión de las proteínas p6 de $\Phi 29$ y GA-1 a las regiones $\Phi 1$ - $\Phi 6$ y P1 en presencia de novobiocina. Para cada situación se dividió el IC registrado en presencia de novobiocina (+Nov) entre el IC registrado en su ausencia (-Nov).

Otra observación interesante es que la proteína p6 de GA-1 registra su afinidad de unión más baja por la región $\Phi 2$, al igual que la p6 de $\Phi 29$, sugiriendo que la curvatura intrínseca de esta región también dificulta la unión de la proteína p6 de GA-1. El efecto de la novobiocina en la unión de p6 de GA-1 al DNA de $\Phi 29$ se puede ver más claramente en la Figura 54C, donde en general los valores máximos de la razón IC_{+Nov}/IC_{-Nov} son más altos en $\Phi 29$ que en GA-1; así por ejemplo, para la región $\Phi 4$ se registró un incremento de 3.7 veces con la proteína p6 de GA-1, mientras que con la p6 de $\Phi 29$ los valores son de más de 16 veces para la misma región (ver Figura 54C).

2.6 Unión *in vivo* de la proteína p6 de $\Phi 29$ al DNA viral y plasmídico en *Bacillus* sp. G1R.

Una vez comprobada la menor dependencia de superenrollamiento de la proteína p6 de GA-1 en su interacción con el DNA, tanto en *Bacillus* sp. G1R como en el sistema heterólogo de *B. subtilis* 110NA, se decidió comprobar si en el entorno intracelular de *Bacillus* sp. G1R la novobiocina estimulaba la unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ al DNA. Para ello se transformaron células competentes de *Bacillus* sp. G1R con el plásmido pPR55w6 (ver apartado 6 de Métodos), obteniéndose la cepa G1R/pPR55w6, que se denominará G1R/p6 $\Phi 29$. Así, se crecieron células de *Bacillus* sp. G1R productoras de p6 de $\Phi 29$ a 30°C hasta alcanzar una densidad de 10^8 células/ml, momento en que se añadió al cultivo 34 μ g/ml de cloramfenicol para inhibir la síntesis de la proteína p6 del bacteriófago GA-1. El cultivo se dividió en dos alícuotas diferentes de 20 ml cada una, y se infectaron con GA-1 a m.d.i.=10, añadiendo formaldehído a una de ellas en el minuto 20 post-infección (Control, C) y novobiocina (+Nov) a la otra a una concentración de 500 μ g/ml, y entrecruzándola diez minutos después. En estas condiciones, como se puede ver en la Figura 55, la novobiocina estimula 5 veces la unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ al extremo derecho del fago GA-1 (región GA5, ver Figura 48), mientras que no se detectó unión al extremo izquierdo (región GA1); indicando probablemente que el mecanismo de inyección del bacteriófago GA-1 también es bifásico como el de $\Phi 29$ y que requiere síntesis de proteínas virales dirigida por el promotor C2, inhibida en presencia de cloramfenicol. Se midió *in vitro* la

afinidad de la proteína p6 de $\Phi 29$ por ambos extremos del DNA genómico de GA-1 (secuencias L y R, señaladas en negro en la Figura 48) empleando la técnica del apantallamiento de la fluorescencia (resultados no mostrados). Este análisis mostró que la constante efectiva de unión (K_{eff}) por ambos extremos es muy similar con un valor $\sim 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Por lo tanto, la ausencia de unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ a la región GA1 *in vivo*, debería estar reflejando la ausencia de internalización del extremo izquierdo de GA-1. La Figura 56A muestra la unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ a la región P1 del plásmido pPR55w6 (ver Figura 22). La unión se incrementa más de 10 veces en presencia de novobiocina (Figura 56B). Los ICs obtenidos fueron un poco más bajos que los detectados para esta misma región en el plásmido pPR55ow6 en infecciones de 110NA con $\Phi 29$ (capítulo 1, Figura 23), debido a que los niveles de expresión constitutivos de p6 de $\Phi 29$ a partir de pPR55w6 son más bajos en *Bacillus* sp. G1R con respecto a los registrados en 110NA (resultados no mostrados).

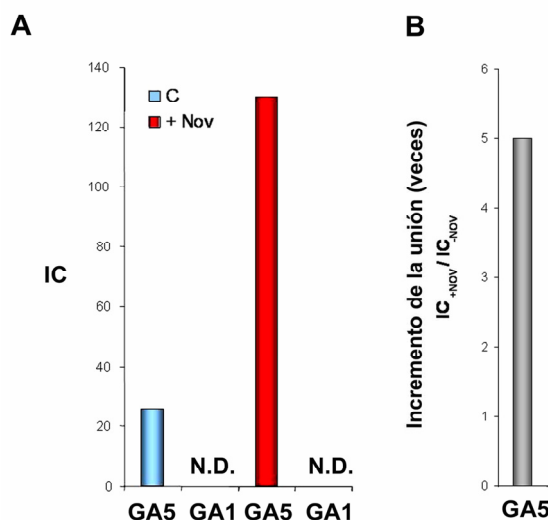


Figura 55. Unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ a los extremos genómicos de GA-1 en *Bacillus* sp. G1R/p6 $\Phi 29$. **A:** Se muestran los ICs en ausencia y presencia de novobiocina (C, +Nov) para los extremos genómicos derecho (GA5) e izquierdo (GA1) de GA-1. **GA5:** 25.8, 130; **GA1:** N.D., N.D.; **B:** Incremento en veces ($\text{IC}_{+\text{Nov}}/\text{IC}_{-\text{Nov}}$) de la unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ a la región GA5. N.D.: no detectado.

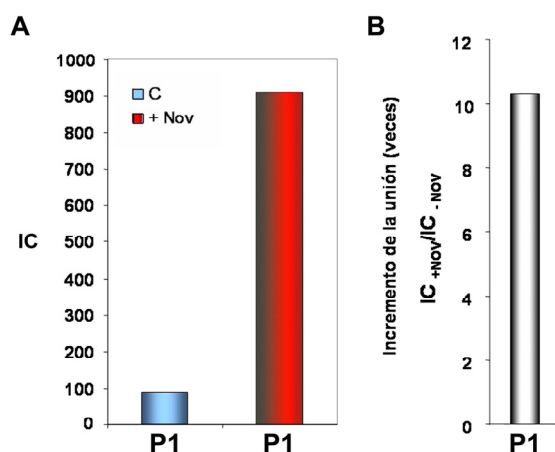


Figura 56. Unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ a la región P1 del plásmido pPR55w6 en *Bacillus* sp. G1R. **A:** Se muestran los ICs en ausencia y presencia de novobiocina (C, +Nov) para la región P1 de pPR55w6. **P1:** 89.4, 911.9; **B:** Incremento en veces ($\text{IC}_{+\text{Nov}}/\text{IC}_{-\text{Nov}}$) de la unión de la proteína p6 de $\Phi 29$ a la región P1.

En conclusión, los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo, sugieren que el comportamiento diferencial, en presencia de novobiocina, de la proteína p6 de $\Phi 29$ en comparación con la de GA-1, es un fenómeno dependiente de la proteína e independiente del entorno intracelular o del DNA.

CAPÍTULO 3. APLICACIÓN DEL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN p6-DNA: IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA TEMPRANA p16.7 EN EL PROCESO DE INYECCIÓN DEL DNA VIRAL

Los fagos se encuentran distribuidos por toda la Biosfera. Entre sus ciclos reproductivos se encuentra comúnmente una fase extracelular, lo que implica que necesariamente han de poseer mecanismos para transportar su material genético a través de las diversas barreras celulares. La habilidad que presentan los fagos para atravesar estas barreras, ha permanecido durante muchos años como uno de los aspectos más desconocidos de la infección viral. En los organismos Gram-negativos, el proceso de inyección está comenzando a ser entendido a un nivel molecular detallado (Molineux, 2001; Letellier *et al.*, 2003; Rossmann *et al.*, 2004), resultando ser un proceso versátil y complejo donde se han podido describir distintas estrategias según los distintos fagos (Lanni, 1968; Snyder y Benzinger, 1981; García y Molineux, 1996). En la mayoría de los casos estudiados, se han descrito proteínas tanto del fago como de la célula hospedadora que se encontrarían involucradas en la internalización de al menos parte del genoma viral, indicando que la inyección dista mucho de ser un proceso pasivo meramente dirigido por la presión acumulada en el interior de la cápsida viral, como se ha propuesto durante muchos años. En contraste con los mecanismos bien caracterizados de internalización de los genomas de algunos fagos de bacterias Gram-negativas, se conoce muy poco a cerca del mecanismo de inyección del DNA de los fagos que infectan bacterias Gram-positivas, como es el caso del bacteriófago $\Phi 29$ y de su célula hospedadora *B. subtilis*.

La capacidad de la proteína p6 para unirse a lo largo del DNA genómico del bacteriófago $\Phi 29$ ha posibilitado su empleo como sonda para poder monitorizar el proceso de inyección del DNA viral a medida que éste penetra en la célula hospedadora (González-Huici *et al.*, 2004b). Para ello, se infectaron células productoras de proteína p6 y a distintos tiempos post-infección se realizaron entrecruzamientos con formaldehído, midiendo por X-ChIP la unión de p6 a las distintas regiones del DNA genómico de $\Phi 29$. A partir de estos estudios se pudo determinar que:

-la polaridad del proceso de inyección es desde el extremo genómico derecho (R) hacia el extremo genómico izquierdo (L), como se muestra en la Figura 58. Este resultado está de acuerdo con la polaridad observada en estudios *in vitro* (Krawiec *et al.*, 1981; Bjornsti *et al.*, 1983).

-El proceso de inyección es un mecanismo que transcurre en dos etapas (González-Huici *et al.*, 2004b). En la primera etapa ("*push*") se produce la entrada de ~65% del genoma viral, presumiblemente gracias a la energía acumulada en el DNA altamente empaquetado en el interior de la cápsida. Para que se lleve a cabo la segunda etapa ("*pull*") se requiere energía en forma de PMF (González-Huici *et al.*, 2006) y la expresión de proteínas virales tempranas, ya que este paso está completamente bloqueado en presencia de cloramfenicol. La(s) proteína(s) viral(es) involucrada(s) en la etapa de *pull* ha(n) de estar codificada(s) en el operón temprano del extremo derecho ya que es el único operón viral presente en la célula después de haberse llevado a cabo la etapa de *push*. Este operón se encuentra bajo el control transcripcional del promotor C2 y contiene los genes 17 y 16.7 y cuatro ORFs (ver Introducción, apartado 2.1, Figura 2 y Figura 58). Se ha podido comprobar que al menos la proteína p17, tiene un importante papel en la internalización eficiente del extremo genómico izquierdo (L), ya que la penetración de este extremo está muy enlentecida en el mutante *sus17(112)* (González-Huici *et al.*, 2004b). Sin embargo, aunque la entrada del extremo genómico izquierdo se encuentra altamente impedida en ausencia de la proteína p17, la entrada del extremo izquierdo no se detecta en células tratadas con cloramfenicol (González-Huici *et al.*, 2004b). Este resultado sugiere que otra(s) proteína(s) viral(es) adicional(es) podría(n) estar involucrada(s) en el proceso de *pull*. El gen 16.7, al igual que el 17, está localizado en el operón derecho y se encuentra altamente conservado en los fagos relacionados con $\Phi 29$ (revisado en Meijer *et al.*, 2001a). La proteína p16.7 (130 aminoácidos) es una proteína de membrana que juega un importante papel en la asociación con la membrana de la replicación del DNA de $\Phi 29$ *in vivo* (Meijer *et al.*, 2000; Meijer *et al.*, 2001b). Los primeros veinte residuos de la proteína p16.7, constituyen un ancla hidrofóbica (región transmembrana) responsable de su localización en la membrana plasmática (Meijer *et al.*, 2001b). Estudios de inmunofluorescencia han demostrado que p16.7 se requiere para la

redistribución de la replicación del DNA de $\Phi 29$, desde los sitios iniciales a nuevos sitios en la membrana de la célula infectada (Meijer *et al.*, 2000). Los análisis *in vitro* llevados a cabo con un derivado soluble de p16.7 donde no se encuentra presente la región transmembrana mostraron que es un dímero con capacidad de unirse al DNA de forma inespecífica, que posee afinidad por la proteína terminal de $\Phi 29$, y que es capaz de autoasociarse formando oligómeros de orden superior al interactuar con el DNA (Serna-Rico *et al.*, 2002; Serna-Rico *et al.*, 2003). Se ha resuelto recientemente la estructura tridimensional de la mitad C-terminal de la proteína p16.7, p16.7C (residuos 63-130, Muñoz-Espín *et al.*, 2004), así como la estructura de p16.7C acomplejada con el dsDNA (Albert *et al.*, 2005; Asensio *et al.*, 2005). Esta última estructura muestra que la unidad de unión de p16.7C está constituida por tres dímeros dispuestos de tal manera que constituyen una superficie de unión al DNA hemicircular cóncava. Estas propiedades de la proteína p16.7 plantearon la posibilidad de que esta proteína pudiese tener un papel en la etapa de *pull* del proceso de inyección del DNA de $\Phi 29$.

3.1 La expresión ectópica de la proteína p6 afecta a la expresión de las proteínas tempranas bajo control transcripcional del promotor C2.

Los estudios previos sobre el proceso de inyección del DNA de $\Phi 29$ se llevaron a cabo en la cepa de *B. subtilis* 110NA portadora del plásmido pPR55w6, a partir del cual se produce la expresión constitutiva de la proteína p6 (Bravo *et al.*, 1994, ver Figura 22 del Capítulo 1), y se basaron en la capacidad que tiene la proteína p6 para unirse al DNA como herramienta para monitorizar el proceso. Bajo estas condiciones, la proteína p16.7, al contrario que p17, no pareció tener un papel relevante en la etapa de *pull*. Sin embargo, el hecho de que esta etapa se encuentra completamente abolida en células tratadas con cloramfenicol, mientras que se encuentra muy enlentecida en células infectadas con el mutante $\Phi 29$ *sus17(112)* (González-Huici *et al.*, 2004b), indica que se requiere(n) proteína(s) viral(es) adicional(es) para completar la etapa de *pull* de manera eficiente. Debido a que el operón temprano del extremo derecho del genoma viral es el único operón internalizado durante la etapa de *push*, sólo las proteínas codificadas en este operón pueden ser responsables de este requerimiento. Debido a que la

proteína p6 reprime el promotor C2 (Whiteley *et al.*, 1986; Barthelemy *et al.*, 1989; Camacho y Salas, 2000) que dirige la expresión del operón temprano derecho que contiene los genes 17 y 16.7, la expresión ectópica de la proteína p6 reprime la transcripción del operón bajo control del promotor C2 inmediatamente después de su internalización. Este efecto sería responsable de que los niveles sintetizados de p16.7 fuesen insuficientes para llevar a cabo su función en la etapa de *pull* del proceso de inyección del DNA, y de que en la cepa productora de p6 el proceso de inyección se encuentre retrasado al menos 20 minutos (González-Huici *et al.*, 2004b).

Para comprobar en que medida la proteína p6 codificada por el plásmido pPR55w6 afecta a la expresión del operón temprano derecho, se comparó la cinética de síntesis de las proteínas 16.7 y p17 en células productoras o no de proteína p6. Para ello se infectaron la cepa productora de p6 (110NA/pPR55w6) y la no productora (110NA/pPR55ow6) con el mutante *sus14*(1242) y se analizaron los niveles de p16.7 y p17 a distintos tiempos post-infección mediante *Western-blot*. Como se puede apreciar en la Figura 57, en ausencia de la proteína p6, las proteínas p16.7 y p17 se detectan a los diez minutos post-infección, sus niveles se incrementan durante los siguientes 10 minutos ($t=20$), alcanzándose los niveles máximos de síntesis durante los siguientes 10 minutos ($t=30$) (Figura 57A y B, parte izquierda; 110NA/pPR55ow6).

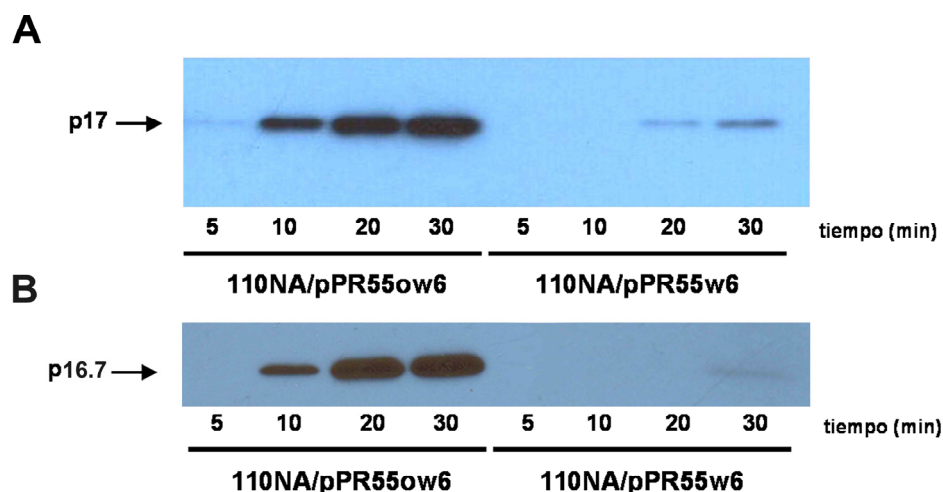


Figura 57. Síntesis de las proteínas tempranas p16.7 y p17 en las estirpes 110NA/pPR55ow6 y 110NA/pPR55w6. Células productoras de p6 (110NA/pPR55w6) y no productoras (110NA/pPR55ow6) se crecieron a 30°C hasta una densidad de 10^8 células/ml, momento en que se infectaron ambos cultivos con $\Phi 29$ *sus14*(1242) a m.d.i.=3. Se tomaron alícuotas de 1.5 ml a los tiempos post-infección indicados y se analizaron por *Western-blot*, utilizando anticuerpos específicos para p16.7 o p17. **A:** Cinética de síntesis de la proteína p17. **B:** Cinética de síntesis de la proteína p16.7.

Sin embargo, en presencia de la proteína p6, la cantidad de p16.7 y p17 se encuentra disminuida drásticamente, detectándose señales muy débiles para ambas proteínas a los 30 minutos post-infección (ver figura 57A y B, parte derecha; 110NA/pPR55w6). Estos resultados demuestran que la expresión ectópica de la proteína p6 reprime fuertemente la expresión de las proteínas p16.7 y p17.

3.2 La ausencia de la proteína p16.7 provoca un retraso en la síntesis de la proteína p6.

Los resultados presentados en el apartado anterior, muestran que en el sistema experimental en el que la proteína p6 se encuentra presintetizada en el interior de la célula antes de comenzar la infección, se produce una fuerte e inmediata represión de la expresión del operón temprano derecho, que podría enmascarar el posible efecto de la proteína p16.7 en la etapa de *pull* del proceso de inyección del DNA viral.

Para comprobar esta hipótesis, se analizó el proceso de inyección del DNA de $\Phi 29$ en células de *B. subtilis* no productoras de p6. Los genes 16.7 y 17 se transcriben a partir del promotor C2 y se encuentran localizados, como se ha comentado anteriormente, en el operón temprano derecho que es internalizado durante la etapa de *push* (ver Figura 58). El gen 6 se transcribe a partir de los promotores A2b y A2c (en la posición ~5 Kb, como se puede ver en la Figura 58) y está localizado en el operón temprano izquierdo que es internalizado durante la etapa de *pull*. De esta forma, la existencia de un impedimento de la etapa de *pull* provocaría un retraso en la síntesis de la proteína p6. Por esta razón, se analizó la cinética de síntesis de p6 en células infectadas con el mutante *sus16.7*(48) mediante *Western-blot*. En paralelo se llevaron a cabo infecciones con los mutantes *sus17*(112), como control de fago afectado en la etapa de *pull*, y *sus3*(91), como control de fago con fenotipo de inyección salvaje. También se analizó la síntesis de proteínas del operón derecho. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 59. Las proteínas codificadas en el operón temprano derecho (p16.7 o p17) fueron detectadas en los tres fagos mutantes en el minuto 10-15 post-infección, indicando que los mutantes empleados no tienen afectada la etapa de *push*.

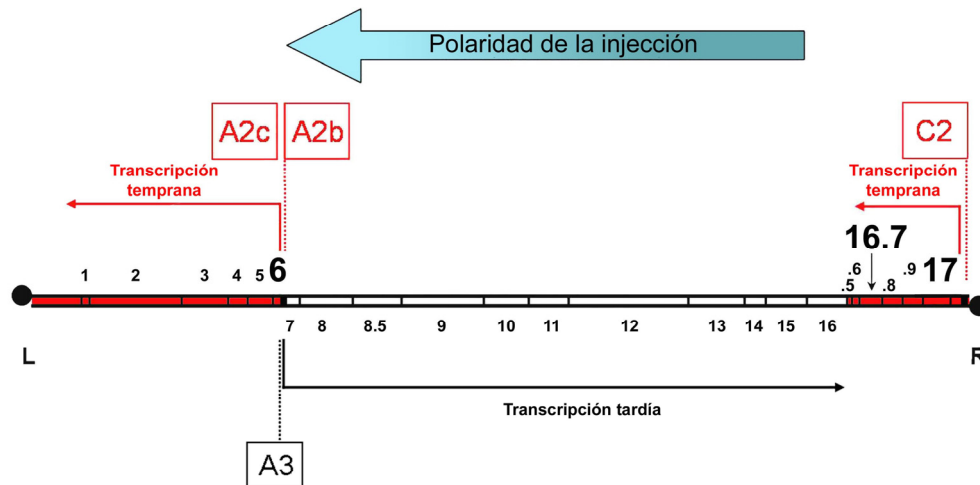


Figura 58. Localización de los genes 6, 16.7 y 17 en sus respectivos operones. Mapa genético del bacteriófago $\Phi 29$ en el que se han señalado en rojo los dos operones tempranos localizados en ambos extremos. Las ORFs 16.5, 16.6, 16.8 y 16.9 se indican como .5, .6, .8 y .9; la longitud de los transcritos se indica mediante flechas así como los principales promotores tempranos A2b, A2c, C2 y el promotor tardío A3. Se han resaltado las proteínas usadas para monitorizar la inyección mediante *Western-blot*. La polaridad de inyección se ha señalado mediante una flecha azul, siendo el extremo derecho (R) el que penetra primero en la célula huésped. La proteína terminal se muestra en negro.

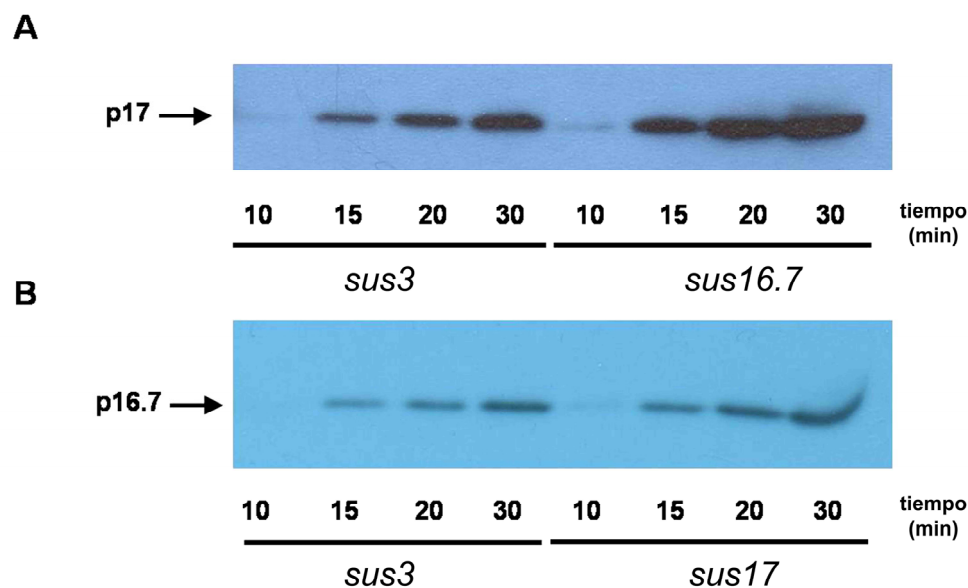


Figura 59. Cinética de acumulación de proteínas codificadas en el operón temprano derecho para los mutantes *sus3*(91), *sus16.7*(48) y *sus17*(112). Células no productoras de p6 (110NA/pPR55ow6) se crecieron a 30°C hasta una densidad de 10^8 células/ml; se distribuyeron en tres cultivos diferentes que se infectaron, respectivamente, con *sus3*(91), *sus16.7*(48) y *sus17*(112) a m.d.i.=3. Se tomaron alícuotas de 1.5 ml a los tiempos post-infección indicados y se analizaron por *Western-blot*, utilizando anticuerpos específicos para las proteínas p16.7 ó p17. El mutante *sus3*(91) se utilizó como control de fago con fenotipo de inyección salvaje. **A:** Cinética de acumulación de la proteína p17 en el mutante *sus16.7*(48). **B:** Cinética de acumulación de la proteína p16.7 en el mutante *sus17*(112).

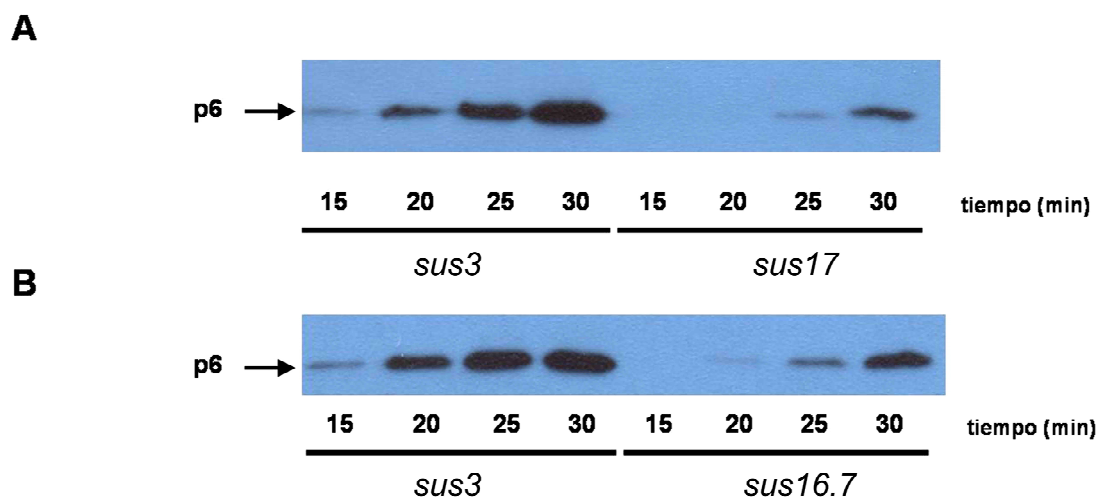


Figura 60. Cinética de acumulación de la proteína p6 en los mutantes *sus3*(91), *sus16.7*(48) y *sus17*(112). Células no productoras de p6 (110NA/pPR55ow6) se crecieron a 30°C hasta una densidad de 10^8 células/ml; se distribuyeron en tres cultivos diferentes que se infectaron, respectivamente, con *sus3*(91), *sus16.7*(48) y *sus17*(112) a m.d.i.=3. Se tomaron alícuotas de 1.5 ml a los tiempos post-infección indicados y se analizaron por *Western-blot*, utilizando anticuerpos específicos para la proteína p6. El mutante *sus3*(91) se empleó como control de fago con fenotipo de inyección salvaje. **A:** Cinética de acumulación de la proteína p6 en el mutante *sus17*(112). **B:** Cinética de acumulación de la proteína p6 en el mutante *sus16.7*(48).

Sin embargo, los tiempos más tempranos en los que la proteína p6 fue detectada fueron los minutos 15, 20 y 25 post-infección para los mutantes *sus3*(91), *sus16.7*(48) y *sus17*(112), respectivamente (Figura 60). Además, aunque en los tres fagos empleados la cantidad de proteína p6 se incrementa con el tiempo, se pueden apreciar diferencias significativas incluso a los 30 minutos post-infección, donde la mayor cantidad de proteína p6 acumulada se detectó en el mutante *sus3*(91). A este mismo tiempo post-infección, la cantidad de proteína p6 en células infectadas con el mutante *sus16.7*(48) fue mayor que la detectada en células infectadas con el mutante *sus17*(112), indicando que la proteína p16.7 está implicada en la etapa de *pull*, aunque su ausencia afecta menos drásticamente a esta etapa en comparación con la ausencia de la proteína p17.

Es conveniente mencionar que la cantidad de proteína p6 acumulada en células infectadas con el mutante *sus16.7*(48) puede estar sobre-estimada (ver Figura 61) ya que, en el minuto 30, en el mutante *sus16.7*(48) ha comenzado la replicación y la cantidad de DNA genómico es el doble con respecto al mutante *sus3*(91). Sin embargo, la cantidad de proteína p6 acumulada es menor.

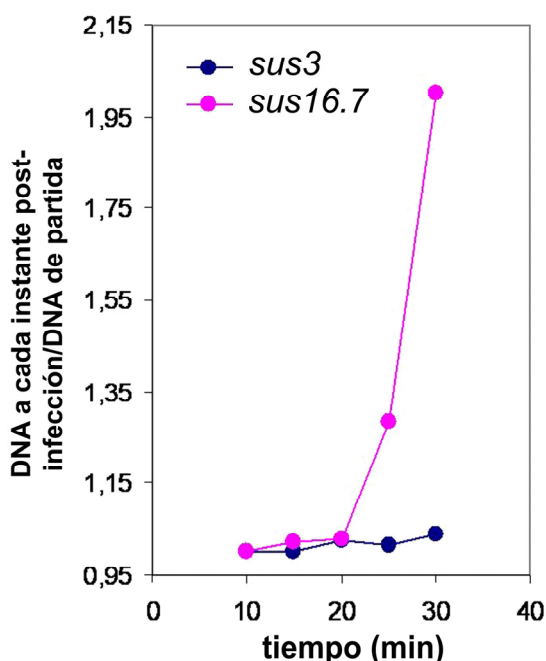


Figura 61. Síntesis de DNA viral en células infectadas por los fagos *sus3*(91) y *sus16.7*(48). Células no productoras de p6 (110NA/pPR55ow6) se crecieron a 30°C hasta una densidad de 10^8 células/ml, el cultivo se dividió en dos infectándose cada uno de ellos a m.d.i.=3 con uno de los dos mutantes. A los tiempos post-infección indicados se tomaron alícuotas de 1ml y se purificó el DNA mediante extracción con fenol/cloroformo. La cantidad de DNA viral (región L) para cada tiempo, se cuantificó mediante PCR en tiempo real y se dividió entre la cantidad de DNA infectante de partida (determinada en el minuto 10 post-infección). Como el mutante *sus3*(91) no replica la relación es siempre 1.

La mayor cantidad de proteína p17 sintetizada en células infectadas con el mutante *sus16.7*(48) con respecto a la encontrada en células infectadas con el mutante *sus3*(91) (ver Figura 59A), de nuevo refleja el retraso en la inyección del extremo izquierdo donde está localizado el gen 6: al existir menor cantidad de proteína p6 no se puede reprimir el promotor temprano C2 con la misma eficiencia que en el mutante *sus3*(91). Este mismo fenómeno explica también la mayor cantidad de p16.7 encontrada en el mutante *sus17*(112) (ver Figura 59B).

3.3 La proteína p16.7 se requiere para llevar a cabo la etapa de *pull* de forma eficiente.

Una vez determinada la existencia de un retraso en la síntesis de proteína p6 en el mutante *sus16.7*(48) mediante *Western-blot*, se decidió monitorizar la entrada del DNA de este mutante mediante X-ChIP (utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína p6), empleando células no productoras de p6. Aunque el principal objetivo al llevar a cabo esta aproximación consistió en analizar si la proteína p16.7 estaba involucrada en la etapa de *pull*, también se analizaron los efectos de la ausencia de la proteína p17 bajo estas condiciones por dos razones. Primero, la ausencia de la proteína p17 en esta situación experimental puede compararse con la situación en la que se

sintetizan niveles salvajes de p17; y segundo, permite comparar efectos diferenciales en el proceso de inyección debidos a la ausencia de la proteína p16.7 o p17. De esta forma, células no productoras se infectaron con los mutantes *sus16.7(48)* o *sus17(112)*, llevándose en paralelo infecciones con los mutantes *sus14(1242)* y *sus3(91)* como controles de fago con fenotipo salvaje y deficiente en replicación, respectivamente. Una consecuencia lógica de este contexto experimental es que los complejos p6-DNA únicamente pueden formarse cuando se ha sintetizado la proteína p6 codificada por el fago. En este sentido, es conveniente resaltar que la infección es un proceso no sincronizado. Este fenómeno se representa en la Figura 62, donde se puede apreciar cómo la proteína p6 producida por los fagos que han inyectado totalmente su genoma, permite monitorizar la inyección de los fagos que todavía no han completado el proceso. En estas condiciones, la segunda etapa del proceso de inyección (*pull*) la llevan a cabo las proteínas tempranas sintetizadas por los fagos que han inyectado completamente su genoma, por lo que no se apreciaría el efecto represor de p6 sobre el promotor C2. Así, células no productoras de p6 (110NA/pPR55ow6) se crecieron a 30°C y cuando se alcanzó una densidad de 10^8 células/ml, se distribuyeron en cuatro cultivos, infectándose cada uno de ellos con *sus3(91)*, *sus14(1242)*, *sus16.7(48)* o *sus17(112)*, a m.d.i.=3. De cada cultivo se extrajeron alícuotas de 20 ml a los minutos 15, 20, 25 y 30 post-infección. Cada alícuota fue incubada inmediatamente con 34 µg/ml de cloramfenicol y 500 µg/ml de novobiocina y entrecruzada con formaldehído 10 minutos después, aplicándose el protocolo habitual de inmunoprecipitación. El grado de penetración del DNA viral se determinó midiendo los ICs para las regiones $\Phi 1$ y $\Phi 6$ a los minutos indicados, que serán denominados IC_L e IC_R , respectivamente. El cálculo de la razón IC_L/IC_R indica el grado de internalización del extremo izquierdo. Teniendo en cuenta que la proteína p6 tiene mayor afinidad intrínseca por el extremo izquierdo ($\Phi 1$) frente al derecho ($\Phi 6$; ver capítulo 1, Figuras 21 y 23), un valor de $IC_L/IC_R \sim 2$ en estas condiciones, indica que el proceso de inyección del extremo izquierdo se ha completado. Un valor de IC_L/IC_R menor de 2, por lo que se ha mencionado anteriormente, indica que el proceso está incompleto. Los valores de IC

calculados para las regiones R y L a los tiempos post-infección indicados se muestran en la Tabla 5.

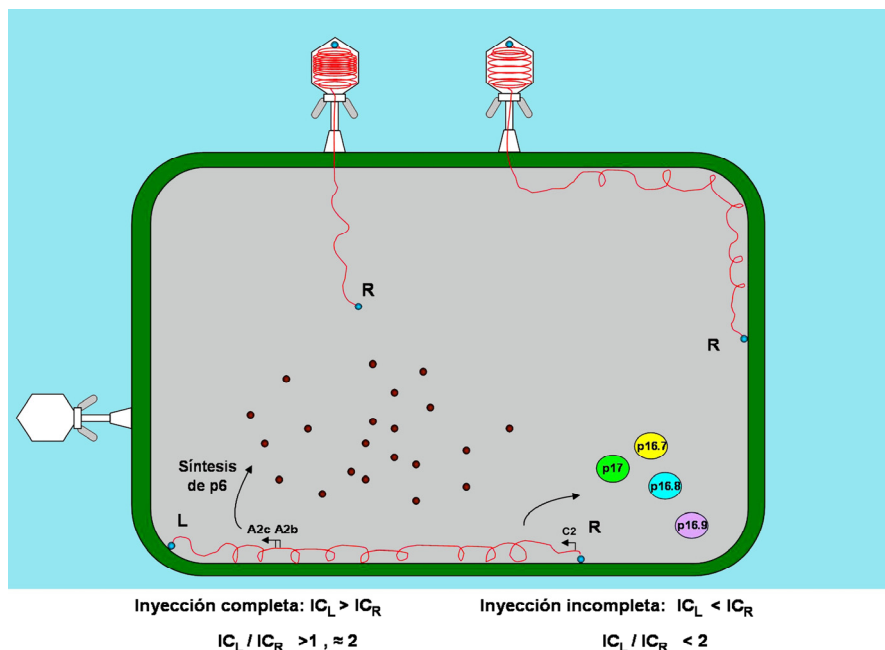


Figura 62. La infección es un proceso no sincronizado. Se representa un fago que ha internalizado completamente su genoma. Primero, se ha llevado a cabo la transcripción muy temprana (sintetizando las proteínas del operón C2: al menos p16.7, p16.8, p16.9 y p17); a continuación, ha internalizado el extremo genómico izquierdo (L), llevando a cabo la transcripción temprana del operón A2b/A2c sintetizándose, entre otras, la proteína p6 que sirve para monitorizar el proceso de inyección en los fagos que no han completado la traslocación de su genoma al espacio intracelular.

	IC _L				IC _R				IC _L /IC _R			
tiempo (min)	<i>sus3</i>	<i>sus14</i>	<i>sus16.7</i>	<i>sus17</i>	<i>sus3</i>	<i>sus14</i>	<i>sus16.7</i>	<i>sus17</i>	<i>sus3</i>	<i>sus14</i>	<i>sus16.7</i>	<i>sus17</i>
15	2237	2967	N.D	N.D.	1064	1539	3	N.D.	2.1	1.92	N.D.	N.D.
20	7137	4846	0.4	N.D.	3000	2962	18	N.D.	2.3	1.64	0.02	N.D.
25	56482	22840	2271	501	32630	10380	1709	1005	1.73	2.2	1.33	0.49
30	58671	26073	4352	2195	40555	13513	2422	2452	1.5	1.9	1.79	0.89

Tabla 5: ICs obtenidos para cada extremo genómico, a cada tiempo post-infección, para los mutantes *sus3*(91), *sus14*(1242), *sus16.7*(48) y *sus17* (112). A la derecha (en verde) se representa el valor de los cocientes IC_L/IC_R. N.D.: no detectado.

Para visualizar las eficiencias de internalización, las razones IC_L/IC_R fueron representadas a los distintos tiempos para cada mutante (ver Figura 63). Para los fagos *sus3*(91) y *sus14*(1242) se alcanzaron valores de la razón IC_L/IC_R alrededor de 2 a los 15 minutos post-infección. Estos resultados indican que, en ausencia de represión del promotor C2 y reflejando por tanto una situación fisiológica, la internalización completa del genoma de $\Phi 29$ se produce en menos de 15 minutos. La situación encontrada para los fagos *sus16.7*(48) y *sus17*(112) fue muy diferente. La inmunoprecipitación de cantidades significativas de región genómica izquierda en el mutante *sus16.7*(48), no fue detectada hasta el minuto 25 ($IC_L=2271$). La inyección completa, $IC_L/IC_R \sim 2$, no se alcanzó hasta el minuto 30 post-infección, indicando un retraso en la etapa de *pull* del proceso de inyección de al menos diez minutos con respecto a la situación salvaje.

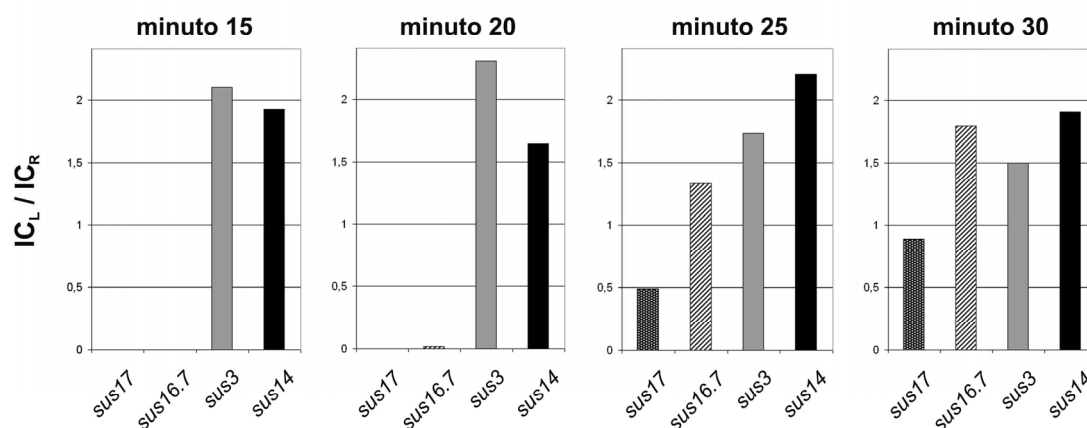


Figura 63. Cinética de inyección del DNA viral en los mutantes *sus3*(91), *sus14*(1242), *sus16.7*(48) y *sus17*(112). La penetración de DNA viral se midió mediante X-ChIP utilizando la proteína p6 producida por el fago infectante. A partir de los valores de IC mostrados en la Tabla 5, se representaron las razones IC_L/IC_R frente al tiempo.

En el caso del mutante *sus17*(112), los fragmentos de DNA correspondientes al extremo derecho fueron también detectados por primera vez en el minuto 25 post-infección. Sin embargo, los ICs obtenidos tanto en este instante como en el minuto 30 post-infección fueron menores que los correspondientes para el mutante *sus16.7*(48). Además, la razón IC_L/IC_R determinada en el minuto 30 post-infección fue todavía menor que 1, indicando que menos del 50% de los genomas del mutante *sus17*(112) han sido internalizados en la célula infectada. En conjunto, estos resultados corroboran que la proteína p17 se requiere para una internalización eficiente de la parte

izquierda del genoma de $\Phi 29$ (González-Huici *et al.*, 2004b; González-Huici *et al.*, 2006) y están de acuerdo con los patrones de expresión de p6 analizados en el apartado 3.2 (Figura 60). Los resultados también muestran que la proteína p16.7 se requiere para el desarrollo eficiente de la etapa de *pull* del proceso de inyección, aunque su ausencia afecta a esta etapa de forma menos severa que la ausencia de p17.

La proteína p6, junto con otras proteínas virales codificadas en el operón izquierdo, es esencial para la replicación del DNA de $\Phi 29$. Por lo tanto, la existencia de un impedimento en la etapa de *pull* debería provocar un retraso en el comienzo de la replicación del DNA viral. Para comprobar esta posibilidad, se cuantificó mediante PCR en tiempo real la cantidad de DNA viral acumulado a diferentes tiempos post-infección, en células no productoras de p6 infectadas con los mutantes *sus14*(1242), *sus16.7*(48) y *sus17*(112). Como se muestra en la Figura 64, mientras el comienzo de la replicación se observó a los 15 minutos post-infección para el fago *sus14*(1242), este proceso se encuentra retrasado al menos 20 y 30 minutos para los fagos *sus16.7*(48) y *sus17*(112), respectivamente.

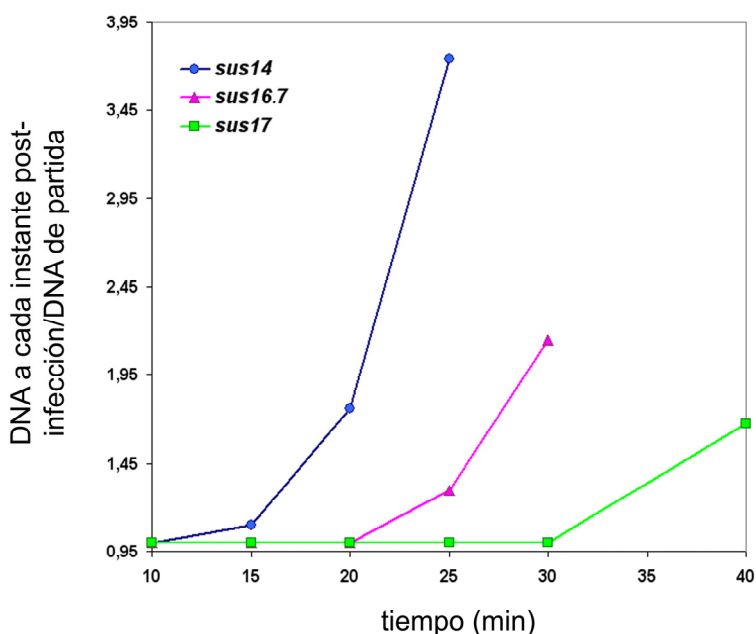


Figura 64. Comienzo de la replicación del DNA viral en células infectadas por *sus14*(1242), *sus16.7*(48) y *sus17*(112). Células no productoras de p6 (110NA/pPR55ow6) se crecieron a 30°C hasta una densidad de 10^8 células/ml; se distribuyeron en tres cultivos diferentes que se infectaron, respectivamente, con *sus14*(1242), *sus16.7*(48) y *sus17*(112) a m.d.i.=3. Se tomaron alícuotas de 1 ml a los tiempos post-infección indicados, se cuantificó la cantidad de extremo izquierdo de DNA viral mediante PCR en tiempo real y este valor se dividió entre la cantidad de DNA infectante de partida (determinada en el minuto 10 post-infección).

En conclusión, la proteína viral temprana p16.7 se requiere, junto con p17, para la ejecución eficiente de la segunda etapa de la inyección del DNA de $\Phi 29$, aunque la ausencia de p17 afecta más drásticamente la etapa de *pull* que la ausencia de p16.7. Además, las diferencias observadas en la internalización de la parte izquierda del genoma del fago en ausencia de p17 y p16.7 están reflejadas en la síntesis retrasada de la proteína p6, codificada por el operón temprano izquierdo, y en el retraso en el comienzo de la replicación del DNA viral.

CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO p6-DNA MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA. EFECTO DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR EN LA FORMACIÓN DEL NUCLEOCOMPLEJO p6-DNA

Una propiedad característica de los sistemas biológicos es la alta concentración total de macromoléculas (entre 50 y 400 mg/ml) que pueden encontrarse en solución o bien formando estructuras diversas. Esta “aglomeración macromolecular” afecta de forma importante a los procesos de asociación y compactación, en los que se produce una disminución del volumen excluido, lo que conduce a una reducción de la energía libre del sistema (Minton, 2000b; Ellis, 2001; Minton, 2001). La proteína p6 del bacteriófago $\Phi 29$ es capaz de autoasociarse generando oligómeros así como interaccionar con el DNA viral formando un nucleocomplejo. Estas propiedades la han convertido en candidata como sistema modelo para estudiar el efecto de la aglomeración molecular en las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA. Estudios preliminares han demostrado que estas interacciones se potencian en presencia de agentes aglomerantes. Mediante ultracentrifugación analítica se ha podido comprobar que la presencia de 50 mg/ml de BSA favorece la oligomerización de p6 (G. Rivas, resultados sin publicar). Ensayos de apantallamiento de la fluorescencia han mostrado que la concentración de proteína p6 necesaria para formar el nucleocomplejo con el DNA es mucho menor en presencia de 400 mg/ml de Ficoll, incrementándose significativamente la constante de afinidad (resultados no mostrados). Durante el desarrollo del bacteriófago $\Phi 29$, la proteína p6 se requiere para la replicación del DNA viral y la represión de la transcripción temprana así como para disparar la transcripción tardía (ver Introducción, subapartado 3.1). La aglomeración macromolecular intervine en la regulación de estos procesos al incrementar la concentración efectiva de la proteína p6 *in vivo*. Por lo tanto, la proteína p6 se puede considerar como un ejemplo para estudiar la influencia de este fenómeno.

En los experimentos *in vitro* realizados con la proteína p6 se ha intentado controlar las condiciones experimentales como la fuerza iónica, el pH, o la composición del sistema, de modo que se asemejen, en la medida de

lo posible, a las condiciones del medio biológico en el que se desarrolla el proceso objeto de estudio. Sin embargo, el conocimiento detallado del mecanismo de autoasociación de la proteína p6 e interacción con el DNA, se ha adquirido a partir de experimentos realizados tradicionalmente en soluciones con muy baja concentración total (menor, aproximadamente, de 1 mg/ml) de macromoléculas (proteína y DNA). Para poder estudiar las interacciones entre macromoléculas en condiciones de aglomeración macromolecular, hay que enfrentarse a grandes dificultades experimentales, derivadas fundamentalmente de la elevada concentración total de macromoléculas presente en este tipo de sistemas. Las desviaciones del comportamiento ideal observadas en estas soluciones producen dificultades en la interpretación de los resultados experimentales obtenidos, que deben ser corregidas con el fin de obtener los verdaderos valores.

Para estudiar el efecto de la aglomeración molecular en la interacción p6-DNA se empleó la técnica de la ultracentrifugación analítica, de gran potencial en estudios de asociación entre macromoléculas en solución. Los métodos de centrifugación analítica permiten detectar y cuantificar especies de diferente masa molecular, por lo que se han utilizado ampliamente en el estudio de interacciones macromoleculares reversibles, que incluyen homo y heteroasociaciones proteína-proteína, proteína-DNA y ligando-receptor (Ralston, 1993; Rivas *et al.*, 1999b).

En primer lugar, se analizó la interacción p6-DNA mediante las aproximaciones de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación. Estos estudios sirvieron a continuación, para estudiar la influencia de la aglomeración macromolecular en la asociación p6-DNA.

4.1 Análisis de la interacción p6-DNA mediante velocidad de sedimentación.

4.1.2 Análisis de velocidad de sedimentación utilizando DNA genómico de Φ 29. La técnica de velocidad de sedimentación es un método hidrodinámico donde los complejos macromoleculares son fraccionados en función de sus diferencias de masa, densidad y forma, midiéndose además su tasa de transporte al someter la muestra a una fuerza centrífuga alta. Para los

experimentos de velocidad de sedimentación se utilizó en primer lugar el DNA genómico de $\Phi 29$, ya que debido a su gran tamaño (19285 pb) tiene capacidad para interaccionar con una gran cantidad de dímeros de proteína p6 (teóricamente $19285/24 \approx 800$ dímeros), generándose un nucleocomplejo de elevado coeficiente de sedimentación fácilmente identificable con respecto al DNA sólo y de la proteína no unida, cuyos coeficientes de sedimentación son menores. Como se puede observar en los perfiles de sedimentación representados en la Figura 65A, a medida que se aumenta la cantidad de p6 incubada con una cantidad fija de DNA, se aumenta la cantidad de proteína unida al DNA genómico formándose un nucleocomplejo que sedimenta antes en el tiempo (ver perfil en negro), lo que se traduce en un mayor coeficiente de sedimentación (Figura 65B).

Estudios previos han indicado que el citoplasma celular experimenta grandes cambios en las concentraciones de agua libre y osmolitos cargados (revisado en Record *et al.*, 1998), como respuesta adaptativa de la célula frente a los cambios en la osmolaridad del ambiente. Estas respuestas celulares implican vastas modificaciones en las concentraciones de iones y otros osmolitos cargados que podrían afectar enormemente las interacciones proteína-DNA *in vivo*. Con la intención de mimetizar esta situación fisiológica, en una de las muestras se analizó el efecto que tiene sobre la interacción p6-DNA, un incremento de diez veces en la concentración de NaCl. En presencia de alta concentración de sal, no se detecta formación del nucleocomplejo y la proteína y el DNA sedimentan como especies separadas de coeficientes 2 y 19 S, respectivamente (Figura 65B, en color rojo).

Una vez comprobado que la interacción p6-DNA puede ser analizada mediante velocidad de sedimentación, se repitió el experimento anterior manteniendo constante una cantidad de DNA genómico de $\Phi 29$ (30 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó con cantidades crecientes de proteína p6, en el rango 1-60 μM (Figura 66). Al sedimentar el nucleocomplejo, es posible determinar la cantidad de proteína unida al DNA, cuantificando la cantidad de proteína que queda en el sobrenadante y por lo tanto no unida al DNA. Ésta se resta a la cantidad de proteína total de partida y el valor que se obtiene representa la proteína unida al DNA (ver apartado 11.1 de Métodos). Siguiendo esta aproximación se

determinaron las isothermas correspondientes a la unión de la proteína p6 al DNA genómico de $\Phi 29$ a baja (50 mM) y alta (500 mM) concentración de NaCl.

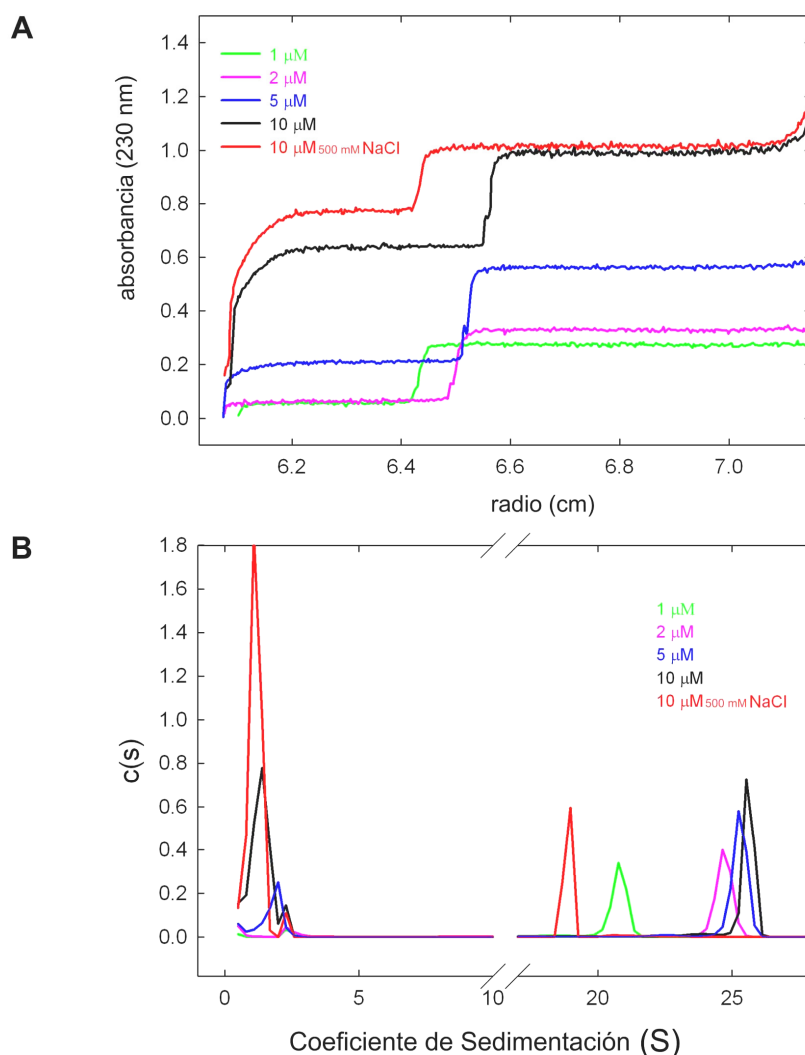


Figura 65: Velocidad de sedimentación del complejo p6-DNA genómico de $\Phi 29$. Se incubaron 30 $\mu\text{g/ml}$ de DNA genómico de $\Phi 29$ con las concentraciones indicadas de proteína p6. Los experimentos se realizaron en Tris-HCl 50 mM, pH=7.5, NaCl 50 mM (salvo que se indique lo contrario), MgCl_2 10 mM. Las muestras se centrifugaron a 30000 rpm y 15°C (ver subapartado 11.1 de Métodos). **A:** Perfiles de sedimentación de las distintas mezclas de p6-DNA 30 minutos después de haber comenzado la centrifugación. **B:** Representación de las distribuciones de coeficientes de sedimentación, de cada uno de los complejos formados en las condiciones indicadas.

Las técnicas de centrifugación permiten analizar las asociaciones entre macromoléculas en el contexto de modelos termodinámicos de asociación (Minton, 2000a). Así, los datos se ajustaron a la función empírica de Hill (ver apartado 11 de Métodos, Ecuación 2), lo que permitió calcular el punto de hemisaturación (L_{50}), a partir del cual es posible determinar la constante de afinidad de la proteína p6 por el DNA genómico, obteniéndose los valores de $1.26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y de $3.16 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a 50 mM y 500 mM NaCl, respectivamente.

También se determinó el índice de Hill, n , con un valor de 1.21, indicando que la asociación de p6 con el DNA tiene una cooperatividad ligeramente positiva (Figura 66).

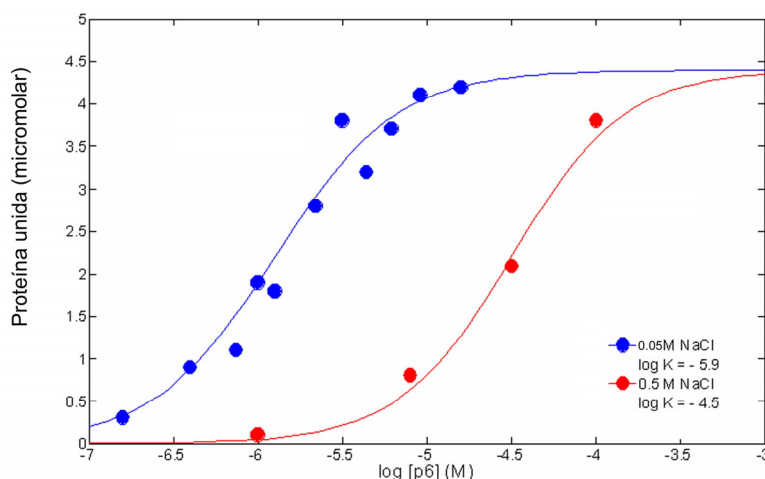


Figura 66: Interacción de la proteína p6 con el DNA genómico de $\Phi 29$. Las concentraciones de proteína p6 utilizadas de partida fueron: 1, 2, 3.5, 5, 7.5, 10 y 13 μM (llevando dos de los puntos por duplicado) y 10, 20, 30 y 60 μM en presencia de 500 mM NaCl. Se incubaron 30 $\mu\text{g/ml}$ de DNA genómico de $\Phi 29$ con las cantidades indicadas de proteína p6. Los experimentos se realizaron en Tris-HCl 50 mM, pH=7.5, NaCl 50 mM (salvo que se indique lo contrario), MgCl_2 10 mM, a 30000 rpm y 15°C , como se describe en el apartado 11.1 de Métodos. En abscisas se representa el logaritmo de la proteína libre (en Molar).

La saturación (B_{max}) se alcanza cuando la concentración de proteína unida es de 4.4 μM , lo que supone 1.06×10^{15} moléculas de p6 unidas al DNA genómico en las condiciones empleadas. En cada muestra sometida a centrifugación, hay 12 μg de DNA genómico de $\Phi 29$ (teniendo en cuenta el volumen de las celdillas de la centrifuga, 400 μl), lo que equivale a un total de 9×10^{14} sitios de unión. Este valor es muy próximo a la cantidad determinada de moléculas de proteína unidas, indicando que todos los sitios de unión del DNA se encuentran saturados con proteína. Al incrementarse la fuerza iónica (muestra en presencia de 500 mM NaCl) se disminuye 4 veces la constante de afinidad de p6 por el DNA ($1.26 \times 10^6 / 3.16 \times 10^5 = 3.98$). Estos resultados son congruentes con los experimentos de titulación directa mediante apantallamiento de la fluorescencia del subapartado 1.4.2 (Figura 34), donde al incrementar la concentración de NaCl se dificulta la unión de p6 al DNA, y muestran la sensibilidad de la interacción frente a cambios de la fuerza iónica del medio.

4.1.2 Análisis de velocidad de sedimentación utilizando el extremo genómico izquierdo (L) de $\Phi 29$. Como se ha descrito en el Capítulo 1, la proteína p6 tiene la capacidad de interactuar *in vivo* con todas las regiones analizadas del genoma del fago $\Phi 29$, supuestamente organizándolo a modo de proteína *histone-like*. Trabajos previos han atribuido a la proteína p6 la función de compactar el DNA viral (Serrano *et al.*, 1993a; Gutiérrez *et al.*, 1994). Sin embargo, las estimaciones del grado de compactación inducido por la proteína sobre el DNA se llevaron a cabo mediante microscopía electrónica. Para comprobar si la proteína p6 compacta el DNA en solución, se analizaron las propiedades hidrodinámicas del complejo formado con el extremo izquierdo del genoma de $\Phi 29$ (L, en negro, Figura 19) mediante ensayos de velocidad de sedimentación. Estos ensayos se llevaron a cabo en las condiciones de saturación del DNA con proteína p6 determinadas en el apartado anterior. En la Figura 67A se comparan los perfiles de sedimentación para cada una de las especies. El nucleocomplejo (p6-L, en rojo) sedimenta en primer lugar, seguido por el DNA solo (L, en azul) y, finalmente lo hace la proteína sola (p6, en verde). Los coeficientes de sedimentación se muestran en la Figura 67B.

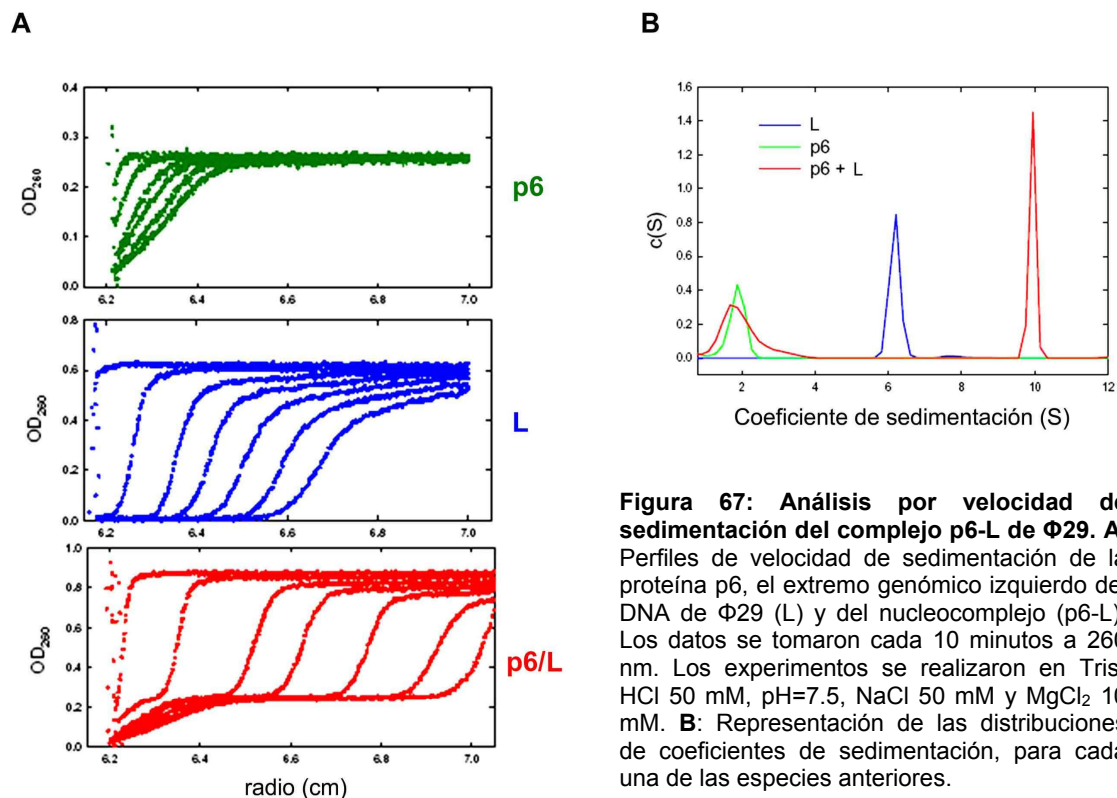


Figura 67: Análisis por velocidad de sedimentación del complejo p6-L de $\Phi 29$. **A:** Perfiles de velocidad de sedimentación de la proteína p6, el extremo genómico izquierdo del DNA de $\Phi 29$ (L) y del nucleocomplejo (p6-L). Los datos se tomaron cada 10 minutos a 260 nm. Los experimentos se realizaron en Tris-HCl 50 mM, pH=7.5, NaCl 50 mM y $MgCl_2$ 10 mM. **B:** Representación de las distribuciones de coeficientes de sedimentación, para cada una de las especies anteriores.

En la Tabla 6 se muestran las masas moleculares medias correspondientes a cada una de las especies empleadas en el análisis de velocidad de sedimentación (M_w), sus coeficientes de sedimentación ($S_{20,w}$) y la proporción de los coeficientes de fricción (f/f_0 , ver apartado 11.1 de Métodos). Esta última informa sobre la asimetría de una macromolécula, correspondiéndose un valor $f/f_0=1$ con una simetría esférica.

Tabla 6: Resumen de las propiedades hidrodinámicas de p6, L y p6-L. (a) asumiendo los coeficientes de hidratación de $\omega=0.3$ g H₂O/g de proteína y $\omega=1$ g H₂O/g de DNA

Especie	M_w (KDa)	$S_{20,w}$	f/f_0 (a)
p6	23.8 ± 0.9	2.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1
L	170.0 ± 0.4	6.2 ± 0.2	3.1 ± 0.2
p6-L	400.0 ± 1.4	10.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2

Como se puede ver en la tabla 6, el valor f/f_0 calculado para la proteína p6 (1.3 ± 0.1) indica que el comportamiento hidrodinámico de la proteína se desvía ligeramente del correspondiente a una partícula esférica ($f/f_0=1$). El comportamiento del extremo genómico de $\Phi 29$ (L), con $f/f_0=3.1 \pm 0.2$, es el que se esperaría de una macromolécula elongada y rígida como una varilla. Sin embargo, para el nucleocomplejo (p6-L), el valor calculado para la relación friccional ($f/f_0=2.1 \pm 0.2$), está comprendido entre los valores de f/f_0 de las especies anteriores (p6, L). Esta menor relación f/f_0 del nucleocomplejo indica que el DNA se encuentra más compactado cuando está asociado a la proteína que cuando está libre.

4.2 Análisis de la interacción p6-DNA mediante equilibrio de sedimentación.

El equilibrio de sedimentación es una técnica muy útil para estudiar cambios en la masa molecular cuando hay asociación de moléculas, y también se utilizó para analizar la asociación de la proteína p6 con el DNA, empleándose en estos ensayos el extremo genómico izquierdo de $\Phi 29$ (L). En

la Figura 68 se comparan los gradientes de equilibrio de sedimentación obtenidos para la proteína p6 (en verde), el DNA (L, en azul) y el nucleocomplejo (p6-L, en rojo), formado en las condiciones de saturación con p6 empleadas en el apartado anterior. En las condiciones de centrifugación empleadas (ver apartado 11.2 de Métodos), la proteína p6 no genera gradiente debido a su baja masa molecular en comparación con el DNA. Cuando se incubaba la proteína y el DNA se genera un nucleocomplejo de mayor masa molecular que el DNA, lo que se traduce en un gradiente que se desvía del comportamiento presentado por el DNA sólo.

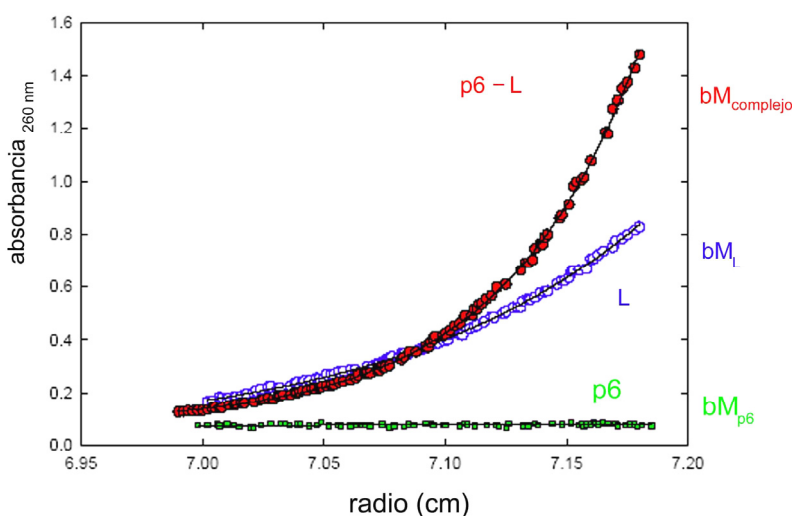


Figura 68: Análisis mediante equilibrio de sedimentación del complejo p6-L. Se muestran los gradientes de equilibrio de sedimentación obtenidos para cada una de las especies: p6 (en verde), L (en azul) y p6-L (en rojo). La absorción se midió a 260 nm, los valores se representaron en función de la posición radial mientras se producía la centrifugación de las muestras. El gradiente obtenido en la mezcla proteína-DNA es el que se esperaría al producirse una interacción atractiva entre ambas especies. Los experimentos se realizaron en Tris-HCl 50 mM, pH=7.5, NaCl 50 mM y MgCl₂ 10 mM.

Este experimento se repitió manteniendo constante la cantidad de DNA (0.1 μ M), e incubándolo con distintas concentraciones de proteína p6 (entre 1 y 100 μ M). A partir de los gradientes obtenidos se determinaron las masas moleculares de flotación de cada una de las especies (ver apartado 11.2 de Métodos). Esta información permitió calcular la cantidad de proteína unida al DNA. Teniendo en cuenta la cantidad de proteína de partida en cada reacción, se pudo determinar también la cantidad de proteína libre. Los resultados se muestran en la Figura 69 (en azul). En paralelo se analizó el comportamiento de la interacción a una concentración de 500 mM NaCl (en rojo). Los resultados se ajustaron de nuevo a la función empírica de Hill, encontrándose

que el DNA llega a estar saturado con p6, la cooperatividad es ligeramente positiva ($n=1.3$) y que se reproducen las distintas afinidades de la proteína por el DNA en presencia/ausencia de 500 mM NaCl.

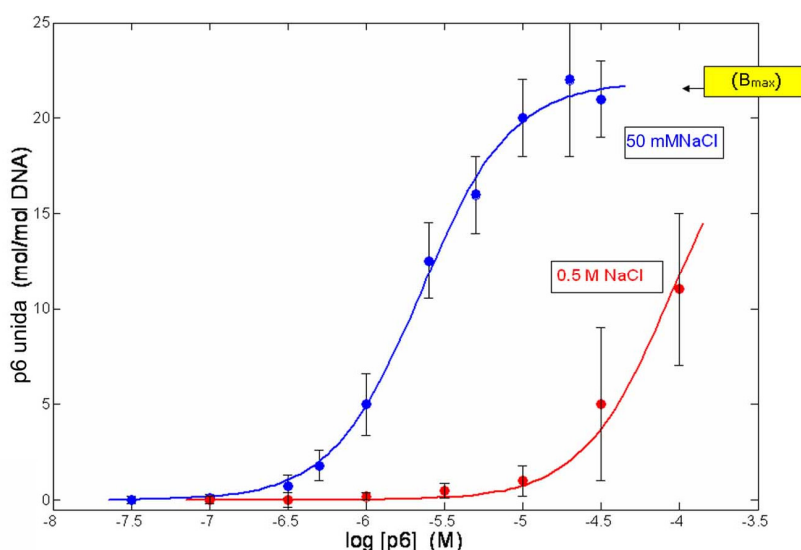


Figura 69: Interacción de la proteína p6 con la secuencia L (extremo genómico izquierdo) de Φ29. Se incubaron concentraciones crecientes de proteína p6 con una concentración fija de extremo genómico izquierdo (0.1 μM). Las condiciones experimentales se muestran en el apartado 11.2 de Métodos. En abscisas se representa el logaritmo de la concentración de proteína p6 libre (en Molar). Los experimentos se realizaron en Tris-HCl 50 mM, pH=7.5, NaCl 50 mM y MgCl₂ 10 mM.

El valor de la constante de afinidad ($25.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) fue similar al que se obtuvo mediante titulación directa en experimentos de fluorescencia ($13.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; capítulo 1, subapartado 1.4.3, Figura 35), teniendo en cuenta que se trata de metodologías diferentes. En presencia de alta concentración de sal (en rojo) la asociación p6-DNA está impedida, obteniéndose una constante de afinidad tres veces menor que la obtenida en ausencia de sal. Sin embargo, una vez que se detecta la interacción p6-DNA, el mecanismo de unión de la proteína al DNA no se modifica, fenómeno que se refleja en el paralelismo de las isotermas. El número de moléculas de p6 necesario para saturar la secuencia L (B_{max}) determinado experimentalmente fue 22. Este valor es muy próximo al calculado teóricamente ($259\text{pb}/12=21.6$ monómeros).

4.3 Efecto de la aglomeración macromolecular en la interacción p6-DNA.

Los compartimentos celulares contienen una elevada concentración de macromoléculas, del orden de varios cientos de mg/ml (Fulton, 1982; Zimmerman y Trach, 1991). En general, en los sistemas biológicos, dicha

concentración tan elevada no se debe a una única especie molecular, sino que se origina en la suma de una gran variedad de macromoléculas del sistema tomadas en conjunto, las cuales además dan lugar a una significativa ocupación del volumen (Figura 8). Por otro lado, la interacción p6-DNA ha demostrado ser fuertemente dependiente de la fuerza iónica. Sin embargo, las interacciones proteína-DNA que se han podido analizar *in vivo*, han resultado ser relativamente independientes de los grandes cambios experimentados en la fuerza iónica que ocurren de manera fisiológica en el citoplasma celular como respuesta frente a la modificación de la osmolaridad del ambiente. Se ha propuesto que la aglomeración macromolecular es un importante factor en el mantenimiento *in vivo* de esta homeostasis de las interacciones proteína-DNA (revisado en, Record *et al.*, 1998). Por esta razón, se planteó el objetivo de revertir el efecto que tiene la fuerza iónica sobre la interacción p6-DNA, empleándose para ello soluciones aglomeradas. En estas condiciones, las repulsiones estéricas inespecíficas pueden influenciar significativamente los procesos bioquímicos debido al incremento que se produce en la actividad química (o “concentración efectiva”) de las especies macromoleculares implicadas. La aglomeración macromolecular puede ser simulada *in vitro* mediante el empleo de concentraciones elevadas de polímeros naturales o sintéticos, denominados “agentes aglomerantes” (p.e Ficoll, dextrano). Existen múltiples trabajos experimentales llevados a cabo con estos agentes, así como estudios teóricos, que han demostrado que la aglomeración macromolecular produce cambios substanciales (órdenes de magnitud) en un amplio espectro de procesos, entre los que se encuentran la cinética y termodinámica de las reacciones de asociación proteína-DNA. Los experimentos recogidos en los apartados 4.1 y 4.2 demuestran que la interacción p6-DNA constituye un modelo de heteroasociación que puede ser analizado con éxito mediante técnicas de ultracentrifugación. Con la intención de estudiar el comportamiento de la interacción p6-DNA en un medio aglomerado, se llevaron a acabo las mismas reacciones en presencia de 500 mM NaCl empleadas en el apartado anterior, pero en presencia de 100 g/l de dextrano T-10 y se sometieron a análisis mediante equilibrio de sedimentación. En estas condiciones de elevado grado de aglomeración macromolecular, es necesario realizar modificaciones en los protocolos experimentales con respecto a los

habitualmente utilizados en solución diluida (ver apartado 11.2 de Métodos), ya que las desviaciones del comportamiento ideal observadas en estas soluciones introducen dificultades en la interpretación de los resultados experimentales obtenidos. En la Figura 70 se comparan las isotermas de unión de p6 al extremo izquierdo a 50 mM (en azul) y 500 mM NaCl (en rojo), mostradas en el apartado anterior (Figura 69) y determinadas en condiciones diluidas, con la isoterma obtenida en presencia de alta sal y 100 g/l de dextrano T-10 (en verde).

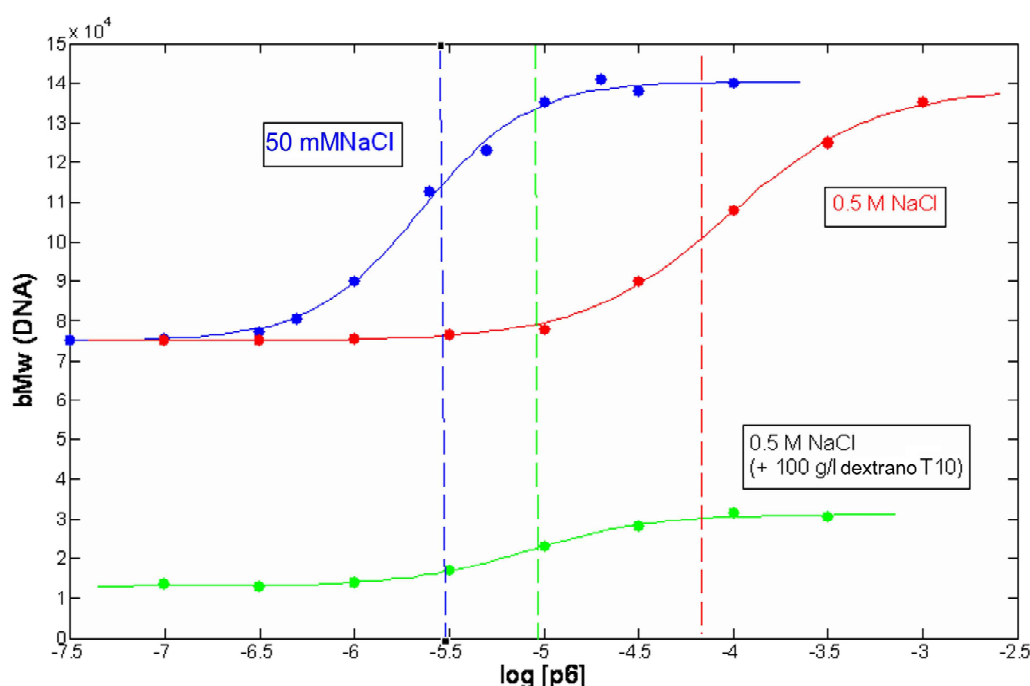


Figura 70: Efecto de la aglomeración macromolecular en la interacción p6-DNA. Concentraciones crecientes de proteína p6 se incubaron con una concentración fija de extremo genómico izquierdo (L) en Tris-HCl 50 mM, pH=7.5, MgCl₂ 10 mM y las concentraciones indicadas de dextrano T-10 y NaCl. En ordenadas se representan las masas moleculares de flotación (bMw) de los nucleocomplejos generados en condiciones diluidas (azul y rojo) y de aglomeración (verde). En abscisas se representa el logaritmo de la concentración de proteína p6 libre (en Molar). Las líneas discontinuas señalan los puntos de hemisaturación.

Como consecuencia de la no idealidad termodinámica, las masas moleculares de flotación aparentes determinadas para las especies presentes en condiciones de aglomeración experimentan una caída en la señal, que debe ser corregida con el fin de obtener los verdaderos valores (ver apartado 11.2 de Métodos). En la Figura 71 se muestra el resultado de estas correcciones y se puede comprobar como en presencia de 500 mM NaCl, el efecto de aglomeración provocado por el dextrano T-10 es capaz de provocar un incremento en la constante de afinidad de hasta 10 veces.

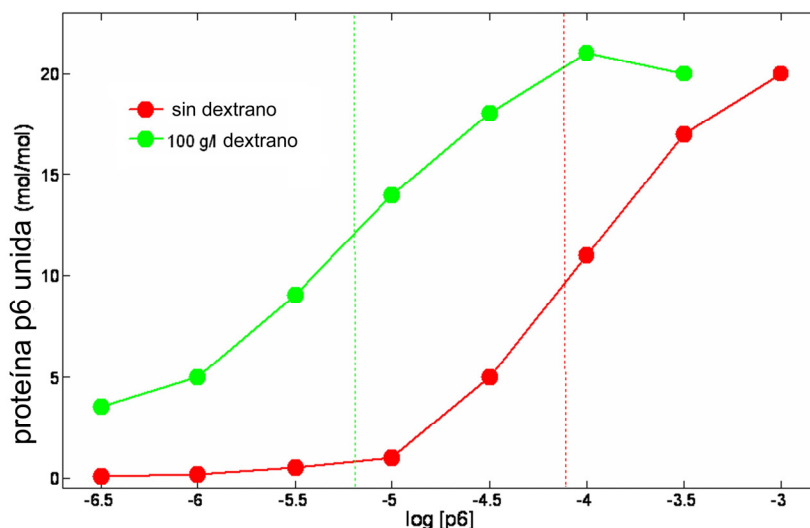
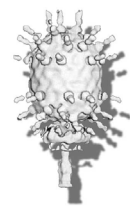


Figura 71: Unión de la proteína p6 a la secuencia L del DNA de Φ29 en presencia de dextrano y 500 mM NaCl. Se representan las moléculas de proteína p6 unidas al extremo genómico izquierdo (L, 0.1 μM) tanto en ausencia (en rojo) como en presencia (en verde) frente al logaritmo de la concentración de proteína libre (en Molar). El cálculo de las moléculas de p6 unidas se llevó a cabo, en condiciones de aglomeración, a partir de las masas moleculares de flotación corregidas (ver apartado 11.2 de Métodos). Los valores calculados para las constantes de afinidad fueron $6.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $6.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ en ausencia y presencia de dextrano T-10, respectivamente.

Este resultado permite visualizar la contribución que ejerce la aglomeración macromolecular del medio en el mantenimiento de la homeostasis de las interacciones proteína-DNA, fenómeno que tendría especial relevancia *in vivo* cuando las condiciones iónicas citoplásmicas cambian drásticamente como consecuencia de los cambios en la osmolaridad del medio extracelular.

Discusión



DISCUSIÓN

El cromosoma bacteriano, con una longitud aproximada de 1 mm, se encuentra en el interior de una célula de pocas micras de longitud; por lo tanto, debe estar organizado en estructuras muy compactas para ocupar el reducido volumen celular disponible. No obstante, el empaquetamiento de genomas en espacios pequeños ha de permitir la conservación de su funcionalidad: los genes han de expresarse, replicarse y segregarse a las células hijas. En prácticamente todos los organismos se han descrito proteínas involucradas en la organización y compactación de los cromosomas. En las bacterias, estas proteínas se han denominado *histone-like* y comparten características tales como bajo peso molecular, elevado número de copias, naturaleza básica y capacidad de alterar la topología del DNA. Participan en la generación de diferentes grados de condensación que mantienen la compactación del cromosoma. En primer lugar, las proteínas asociadas al nucleoide como IHF o HU aseguran un primer grado de compactación a nivel de 10-100 pb (Azam *et al.*, 2000). En segundo lugar, las proteínas tipo SMC ("*SMC-like*") aseguran un nivel superior de condensación mediante la compactación del DNA en una estructura repetitiva estable (Case *et al.*, 2004). En tercer lugar, el cromosoma bacteriano está dividido en dominios topológicos independientes, de unos 10 Kb, que limitan la difusión del superenrollamiento (Figura 1). Procesos como la compactación de los genomas, la replicación del DNA, la transcripción o la recombinación, ocurren en todos los organismos y todos ellos necesitan estar regulados y coordinados para poder obtener actividad biológica. Las proteínas *histone-like* contribuyen a la remodelación continua del nucleoide, según las necesidades fisiológicas de la célula en cada momento, participando en la regulación de la expresión génica e interviniendo en los procesos cruciales mencionados anteriormente (Thanbichler *et al.*, 2005b). Se trata por tanto de proteínas con efectos pleiotrópicos como, por ejemplo H-NS, que afecta la transcripción de varios genes involucrados en diversos procesos (Dorman, 2004). Otra proteína *histone-like*, HU, estimula la acción de diferentes proteínas que interaccionan con el DNA (Betermier *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 2002), reprime determinados promotores junto con otras proteínas formando complejos multiproteicos de orden superior (Lewis *et al.*, 1999), participa en la

iniciación de la replicación del DNA asistiendo a otras proteínas (Polaczek *et al.*, 1998), o está involucrada en regulación post-transcripcional (Balandina *et al.*, 2001).

1. UNIÓN DE LA PROTEÍNA p6 AL DNA DEL BACTERIÓFAGO Φ 29 DE *B. subtilis*

La proteína p6 es esencial para la replicación del DNA de Φ 29 *in vivo* (Carrascosa *et al.*, 1976; Mellado *et al.*, 1980; Bravo *et al.*, 1994; Camacho y Salas, 2000). *In vitro* es capaz de unirse al DNA de Φ 29, activando la iniciación de la replicación (Pastrana *et al.*, 1985; Serrano *et al.*, 1989), e interviniendo en el control de la transcripción (Whiteley *et al.*, 1986; Barthelemy *et al.*, 1989; Elías-Arnanz y Salas, 1999; Camacho y Salas, 2000). Por microscopía electrónica se ha descrito que es capaz de unirse a todo el DNA de Φ 29 (Gutiérrez *et al.*, 1994); de hecho, la p6, junto con la SSB viral (p5) es la proteína viral más abundante, produciéndose desde los primeros momentos de la infección, y llegando a los 30 minutos post-infección a cerca de 700000 copias, 1.4 veces la cantidad necesaria para cubrir la totalidad del DNA de Φ 29 sintetizado (Abril *et al.*, 1997). Estos hallazgos han llevado a proponer para la proteína p6 una función en la organización y compactación del genoma viral, así como en su replicación y regulación de la expresión génica, actuando a modo de *histone-like*, siendo indispensable analizar la unión de p6 *in vivo* para la confirmación de esta hipótesis. Utilizando la técnica de X-ChIP, se ha demostrado que la proteína p6 del bacteriófago Φ 29 de *B. subtilis* se une *in vivo* a lo largo del genoma viral, como correspondería a una proteína tipo *histone-like*. En seis regiones (Φ 1- Φ 6) distribuidas a lo largo del genoma viral (Figura 19) que suponen ~30% de su secuencia, se detectó unión de la proteína, indicando que p6 forma un complejo nucleoproteico a lo largo de la mayor parte, si no de la totalidad, del genoma del fago. Sin embargo, la afinidad de p6 por las seis regiones no fue igual. La mayor unión se registró en ambos extremos del genoma (Figura 21, regiones Φ 1 y Φ 6), mientras que la afinidad de la proteína por las regiones internas, especialmente Φ 2, fue menor. Esta mayor afinidad de p6 por los extremos del genoma frente a las regiones internas, probablemente está relacionada con la activación de la iniciación de

la replicación ya que los orígenes están localizados en ambos extremos del genoma viral (Pastrana *et al.*, 1985; Blanco *et al.*, 1986). En el extremo derecho del DNA de $\Phi 29$ (región $\Phi 6$), la proteína p6 desempeña un doble papel: además de activar la replicación, reprime el promotor temprano C2 (Barthelemy *et al.*, 1989), que dirige la expresión de proteínas involucradas en la inyección del DNA del fago, y por tanto necesarias en la fase temprana de la infección (González-Huici *et al.*, 2004b). La afinidad de la proteína p6 por esta región es alta para asegurar la rápida represión del promotor C2 al comienzo del ciclo infectivo, cuando la concentración de la proteína p6 todavía es baja. La afinidad particularmente baja de p6 registrada por la región de control transcripcional, $\Phi 2$ (incluida en el fragmento 5.1 *in vitro*), es debida a la presencia de una curvatura intrínseca, localizada en el sitio de unión de la proteína p4 en el promotor A2b (Barthelemy y Salas, 1989; Rojo *et al.*, 1990), como han demostrado estudios *in vitro* (González-Huici *et al.*, 2004a). Esta baja afinidad de p6 por la región $\Phi 2$ registrada *in vivo* (e *in vitro* por el fragmento 5.1, Figura 35) podría ser esencial para el correcto desarrollo temporal del programa transcripcional del fago. La proteína p6 incrementa la afinidad de la proteína p4 a su lugar de unión en el promotor tardío A3 (Elías-Arnanz y Salas, 1999), provocando la represión de los promotores tempranos A2b y A2c y activando el promotor tardío A3 (Elías-Arnanz y Salas, 1999; Camacho y Salas, 2001). Debido a la elevada cantidad de proteína p6 sintetizada durante la infección, la afinidad de p6 por esta región debe ser baja para prevenir el paso prematuro de la transcripción temprana a la tardía, lo que provocaría el acortamiento del ciclo infectivo y conduciría a una disminución en la producción de partículas virales. Para determinar las causas que provocan las diferencias de afinidad *in vivo* en la interacción p6-DNA de $\Phi 29$, la unión de p6 también se estudió *in vitro*, mediante apantallamiento de la fluorescencia (Figura 35), a las seis secuencias amplificadas incluidas en las regiones $\Phi 1$ - $\Phi 6$, reproduciéndose las distintas afinidades encontradas *in vivo* mediante X-ChIP. Si bien las diferencias de unión son menos pronunciadas *in vitro*, especialmente en términos de las regiones terminales vs las centrales, son cualitativamente análogas a las encontradas *in vivo*.

La interacción p6-DNA se favorece cuando disminuye el superenrollamiento negativo (González-Huici *et al.*, 2004c). De esta forma,

para descartar que las diferencias de afinidad *in vivo* pudiesen ser debidas a que el DNA de Φ 29 se encontrase organizado en distintos dominios topológicos con grados diferentes de superenrollamiento, que condicionasen la unión de p6, ésta se midió *in vivo* a los extremos genómicos localizados en un mismo contexto topológico, al encontrarse clonados en el plásmido pACYC184 (Figura 30). En estas condiciones, la proteína p6 se unió con mayor afinidad a los extremos genómicos virales con respecto a la región P2 del plásmido. Sin embargo, la mayor afinidad de la proteína se registró por la secuencia concatémica C(24), también clonada en el plásmido pACYC184, y constituida por doce repeticiones de la secuencia de 24 pb presente en el extremo izquierdo del DNA de Φ 29 (Serrano *et al.*, 1993a), cuya predicción de curvabilidad (Satchwell *et al.*, 1986), alternando máximos y mínimos cada ~6 pb, favorecería la formación del nucleocomplejo. Además, mediante apantallamiento de fluorescencia, se comprobó que la afinidad de p6 por la secuencia C(24) es mayor que por el extremo izquierdo del DNA de Φ 29 (Figura 39). Por tanto, la mayor afinidad de la proteína p6 por los extremos del DNA de Φ 29, registrada tanto *in vivo* (Figura 21) como *in vitro* (Figura 35), se puede atribuir, más que a la organización del genoma de Φ 29 en distintos dominios topológicos, a la presencia de secuencias con propiedades de curvabilidad que favorecerían la formación del complejo p6-DNA, según se ha descrito previamente (Serrano *et al.*, 1989; Serrano *et al.*, 1990). De hecho, al modelar la secuencia C(24) en el servidor Web Model.it®, se puede apreciar como el eje del DNA presenta una estructura ligeramente “sinusoidal” (Figura 72), que podría sugerir la tendencia a la curvatura. Al tener estas curvaturas una periodicidad mayor que la del DNA se generaría una hélice dextrógira (ver Figura 6). De hecho, las estructuras oligoméricas formadas por la proteína p6 también presentan una estructura helicoidal dextrógira (Abril *et al.*, 1999), lo que está de acuerdo con resultados obtenidos recientemente en proteínas iniciadoras de la replicación (Erzberger *et al.*, 2006). La formación de complejos nucleoproteicos helicoidales dextrógiros que facilitarían la apertura de regiones de DNA y el ensamblaje de la maquinaria replicativa, se ha propuesto como mecanismo universal de iniciación de replicación (O'Donnell y Jeruzalmi, 2006). De acuerdo con esta hipótesis, el genoma de Φ 29 presenta repeticiones terminales cortas en cada extremo genómico constituidas por tres

adeninas consecutivas (o timinas, según la hebra del DNA que se observe), que podrían actuar de forma similar a los “elementos de apertura de DNA” presentes en el *OriC* de *E. coli*, que son secuencias ricas en AT que constituyen regiones de baja estabilidad helicoidal que con un bajo aporte de energía tienen tendencia a abrirse. Las proteínas iniciadoras, *dnaA* en organismos procarióticos u ORC en eucarióticos, reconocen secuencias específicas e interaccionan con DNA en sitios discretos. La proteína p6, ejemplo claro de economía génica, tiene otras funciones además de activar la replicación, de ahí que no reconozca una secuencia específica, ya que para compactar el genoma debe unirse a todo él, si bien las distintas transacciones que se llevan a cabo en distintos sitios del genoma viral, estarían moduladas por su distinta afinidad por distintas secuencias.

Para profundizar en el efecto que la curvabilidad de la secuencia ejerce en la unión de p6 se decidió modificar la periodicidad de alternancia de máximos y mínimos de curvabilidad cada ~6 pb, lo cual debería desfavorecer la unión de p6. Para evaluar esta hipótesis se construyeron varias secuencias concatémicas derivadas de C(24), y la afinidad de p6 por cada concatémico se midió mediante apantallamiento de la fluorescencia. De esta forma se pudo comprobar que al modificar la periodicidad ideal predicha previamente (Serrano *et al.*, 1989), se disminuye la K_{eff} de la proteína p6 por la secuencia, como ocurre con las secuencias 11IZQ y C22 (Figura 39), en comparación con las K_{eff} obtenidas para las secuencias C(24), 12IZQ y 12CENT (Figura 39).

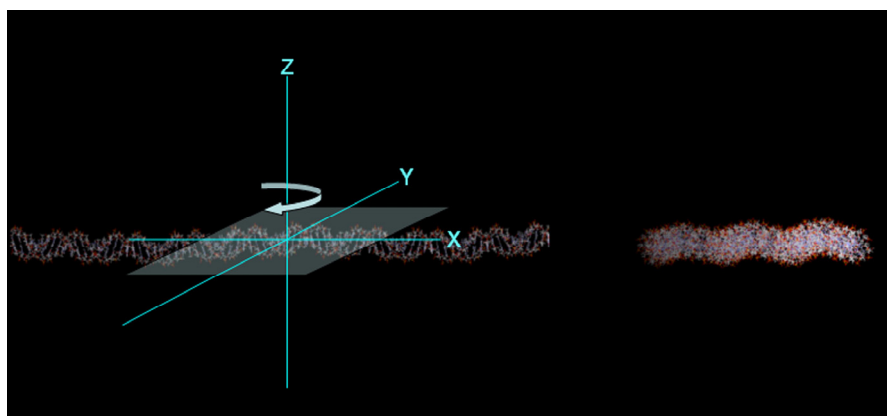


Figura 72. Estructura tridimensional de la secuencia C(24) generada mediante el servidor Model.it®. Este servidor genera un modelo tridimensional en coordenadas pdb, a partir de una secuencia de nucleótidos basándose en parámetros geométricos determinados mediante cristalografía de rayos-X (Gorin *et al.*, 1995). Al girar la molécula sobre el plano 45° en sentido de la flecha azul, se puede apreciar la estructura “sinusoidal” que presenta esta secuencia de DNA.

Estos resultados, de nuevo son consistentes con que la mayor afinidad que presenta la proteína p6 por los extremos genómicos del DNA viral pueda ser explicada debido a la presencia de secuencias con propiedades de curvabilidad que favorecen la formación del complejo p6-DNA. Además, p6 muestra una dificultad para terminar de saturar las secuencias concatémicas 12IZQ y 12CENT con respecto a C(24), que podría estar reflejando la forma en que los monómeros de proteína interaccionan consigo mismos y con el DNA. Cada monómero de p6 cubre 12 pb del DNA, de tal forma que las secuencias 12IZQ y 12CENT, constituidas por la repetición en tándem de 12 pb, presentan un único tipo de sitio de unión para los monómeros de p6 a lo largo de toda la molécula de DNA. Sin embargo, C(24) presenta dos tipos de sitios diferentes de unión para los monómeros de proteína, ya que esta molécula está constituida por la repetición en tándem de 24 pb en vez de 12 pb. Como el patrón de curvabilidad para 12IZQ, 12CENT y C(24) presenta la misma fase de alternancia de máximos y mínimos de curvabilidad, es lógico asumir que las únicas diferencia entre estas moléculas, al considerarlas como sustratos de p6, es la presencia de un único tipo de sitio de unión (12IZQ y 12CENT) o de dos tipos distintos de sitios de unión [C(24)]. Dado que la proteína p6 ha mostrado tener mayor dificultad para saturar los concatémicos 12CENT y 12IZQ con respecto a la secuencia C(24) (Figura 39), y que en los 24 pb que componen la unidad de repetición en esta última secuencia se puede observar como hay 7 pb repetidos invertidos (ver Figura 73), estas observaciones podrían reflejar el posicionamiento también invertido de los monómeros de cada dímero sobre el DNA.

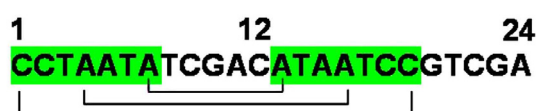
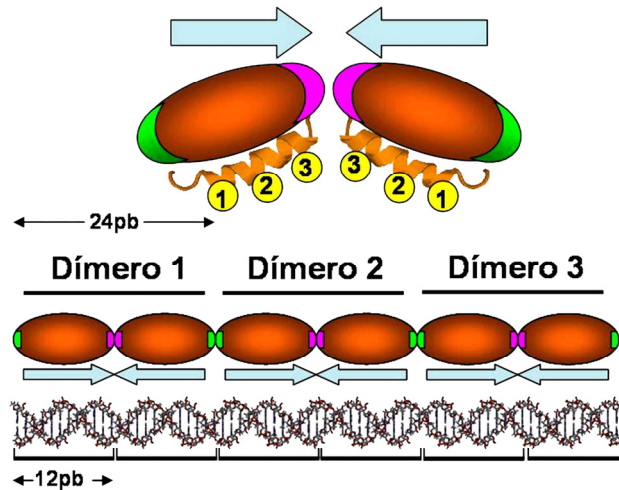


Figura 73: Localización de los nucleótidos repetidos invertidos en la secuencia concatémica C(24).

Este modelo de interacción implicaría que la región de la estructura tridimensional de la proteína involucrada en la dimerización es distinta a la que se encuentra involucrada en la oligomerización. De acuerdo con esta forma de interacción, la constante de dimerización, con un valor de $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Abril et



Si la proteína p6 efectivamente se encarga de la organización y compactación del genoma viral, y al mismo tiempo no reconoce una secuencia específica, sino determinadas características de curvabilidad, es lógico pensar que exista alguna señal reconocible que permita a p6 distinguir el DNA de $\Phi 29$ del bacteriano. Se ha sugerido que la señal de reconocimiento puede ser el estado topológico del DNA de $\Phi 29$ (revisado en Serrano *et al.*, 1994). La proteína p6 se une a lo largo del DNA de $\Phi 29$ con mayor afinidad que al DNA plasmídico (Figura 23). Se sabe que la unión de p6 mantiene supervueltas positivas en un DNA circular cerrado lo que haría termodinámicamente desfavorable la unión de p6 a un DNA superenrollado negativamente, con lo que se uniría preferentemente a un DNA como el de $\Phi 29$, que podría tener un superenrollamiento negativo menor que el DNA plasmídico, ya que al tener una proteína terminal en ambos extremos 5', no está covalentemente cerrado. Este fenómeno podría explicar la especificidad *in vivo* de la proteína p6 por el DNA viral, ya que éste se encontraría, según la hipótesis, menos negativamente

superenrollado que el DNA genómico celular y el DNA plasmídico. De esta manera, la dependencia de superenrollamiento en la interacción p6-DNA sería una estrategia que permitiría a la proteína del fago unirse específicamente al DNA de $\Phi 29$ discriminándolo del celular. Para comprobar la validez de esta hipótesis, se analizó la unión de p6 *in vivo* en presencia de novobiocina, un inhibidor de la girasa celular cuya actuación provoca la disminución del superenrollamiento negativo del DNA. La unión de la proteína p6 a las regiones $\Phi 1$ - $\Phi 6$ aumenta dramáticamente *in vivo* en presencia de novobiocina, aunque se mantiene la afinidad relativa de la proteína por las distintas regiones del DNA de $\Phi 29$, siendo mayor por los extremos genómicos (Figura 23). Este resultado, junto con las afinidades registradas *in vitro* (Figura 35), nuevamente sugieren que la afinidad de p6 por el DNA de $\Phi 29$ se debe a propiedades intrínsecas de cada secuencia de DNA. También, aunque en menor medida, aumenta la unión de la proteína p6 al DNA plasmídico (Figura 23), lo que está de acuerdo con que, como se ha visto *in vitro* (Serrano *et al.*, 1993a), la proteína p6 mantiene superenrollamiento positivo *in vivo*.

El incremento de la unión de p6 en presencia de novobiocina indica, además, que el dsDNA lineal de $\Phi 29$ se encuentra restringido topológicamente. De no ser así, la adición de la novobiocina no debería tener efecto en la unión de la proteína p6. De hecho, en presencia de ácido nalidíxico, inhibidor de la actividad endonucleasa-ligasa de la girasa y que, por tanto, no modifica la topología del DNA, no se incrementa la unión de p6 (Figura 23). Otra evidencia de la restricción topológica del genoma de $\Phi 29$ es la inhibición de la replicación viral en presencia de inhibidores de la girasa bacteriana (Figura 24A y 24B), indicando la necesidad de esta proteína celular en el desarrollo del fago, como se ha descrito para el fago T5 (Constantinou *et al.*, 1986). La mayor inhibición observada con novobiocina, en comparación con la del ácido nalidíxico, podría ser debida al aumento excesivo de afinidad de p6 por el DNA viral, que implicaría una pérdida de dinamismo en la interacción que sería contraproducente para el desarrollo normal de la replicación.

La restricción topológica del DNA de $\Phi 29$ se debe probablemente a su interacción con la membrana plasmática (Ivarie y Pène, 1973), presumiblemente a través de la proteína terminal (TP), que posee afinidad

intrínseca por la membrana (Bravo y Salas, 1997). Aunque también podrían estar involucradas otras proteínas virales como p1 y p17 ya que son necesarias para el mantenimiento de una correcta topología del DNA viral (Tablas 3 y 4). De hecho, la proteína p1 es capaz de interaccionar directamente con la TP (Bravo *et al.*, 2000). Por otro lado, estudios de inmunolocalización han mostrado que la proteína p17 forma una estructura helicoidal similar a la formada por proteínas citoesqueléticas de *B. subtilis* y que podría estar asociada a la membrana a través de otras proteínas (Muñoz-Espín, resultados sin publicar). La alteración en la topología del DNA viral sufrida en ausencia de p1 y p17, podría justificarse por un aumento en el nivel de superenrollamiento negativo, lo que se traduciría en un impedimento de la unión de p6. Este impedimento repercutiría en la replicación del DNA de los mutantes *sus1*(629) y *sus17*(112) (Figura 26A y 26B), que está fuertemente impedida posiblemente debido a la dificultad de la proteína p6 para unirse al DNA.

2. UNIÓN DE LA PROTEÍNA p6 DEL BACTERIÓFAGO GA-1 AL DNA

Para la proteína p6 del bacteriófago GA-1 se ha descrito una función similar a la de Φ 29 en la estimulación de la iniciación de la replicación (Freire *et al.*, 1996) y regulación de la transcripción temprana (Horcajadas *et al.*, 2001). Sin embargo, el complejo que forma la proteína p6 de GA-1 con el DNA tiene una estructura distinta a la encontrada en Φ 29, ya que la proteína se une cada 11 nt en vez de cada 12; por otra parte, la inducción de superenrollamiento que esta proteína ejerce sobre un DNA plasmídico es menor, en comparación con la p6 de Φ 29 (Freire *et al.*, 1996). Estos datos, hicieron pensar que aunque en líneas generales la función y estructura de la proteína p6 de GA-1 sean muy parecidas a las de Φ 29, pudiesen presentar detalles relevantes que las diferenciasen en su comportamiento. En el capítulo 2 de esta tesis se ha estudiado la unión de la proteína p6 de GA-1 a las distintas regiones de su DNA *in vivo*, así como la dependencia de superenrollamiento en su unión. Para ello se empleó la misma aproximación experimental utilizada con Φ 29, basada en la técnica de X-ChIP. De esta forma

se pudo comprobar que la proteína p6 de GA-1 se une a todas las regiones analizadas del DNA de GA-1 (GA1-GA5, lo que supone ~25% del genoma viral) (Figura 49), sugiriendo, al igual que se ha propuesto para la proteína p6 de Φ 29, que actúa a modo de *histone-like*, interviniendo en la organización y compactación del genoma viral. Además, al igual que la situación descrita para Φ 29 (Figuras 21 y 23), la proteína p6 de GA-1 se une *in vivo* con mayor afinidad a los extremos del genoma viral, fenómeno que está de acuerdo con la estimulación de la iniciación de la replicación descrita *in vitro* para esta proteína (Freire *et al.*, 1996), así como la represión *in vitro* del promotor C2, posicionado en el extremo derecho del DNA (Horcajadas *et al.*, 2001).

La replicación del DNA de GA-1 se inhibe en presencia de novobiocina (Figura 50) poniendo de manifiesto, al igual que ocurre en Φ 29 o T5, la necesidad de la girasa celular para el desarrollo del fago, y que el genoma viral se encuentra restringido topológicamente, debido probablemente a su asociación con la membrana. Sin embargo, la unión de la proteína p6 de GA-1 al DNA no aumentó significativamente en presencia de novobiocina (Figura 49). Estos resultados indican que la dependencia del grado de superenrollamiento en la interacción de la proteína p6 de GA-1 con el DNA es diferente a la descrita para el complejo nucleoproteico formado por la proteína p6 de Φ 29 (ver Figura 23). No obstante, se pudo encontrar una débil estimulación en la unión de la proteína p6 de GA-1 al DNA producida por la novobiocina, al expresar la proteína en *B. subtilis* 110NA (Figuras 52 y 54). Esta menor dependencia de superenrollamiento se podría justificar en función de la distinta estructura del complejo nucleoproteico formado, ya que la proteína p6 de GA1 se une a su propio DNA con una periodicidad de 11, en lugar de 12 como lo hace la de Φ 29. Así, en el caso de p6 de Φ 29 la repetición helicoidal de superficie (ver Figura 5), $h_c = 12$ (Serrano *et al.*, 1990), con lo cual el superenrollamiento es dextrógiro y por tanto mantiene supervueltas positivas en un DNA covalentemente cerrado y tratado con topoisomerasa I (Serrano *et al.*, 1993a). Esta situación implicaría que la proteína p6 de Φ 29 tendría mayor afinidad por DNAs con menor superenrollamiento negativo, como realmente ocurre (González-Huici *et al.*, 2004c). En el caso de la proteína p6 de GA-1, $h_c = 11$ (Freire *et al.*, 1996), por lo que el superenrollamiento también es dextrógiro e induce supervueltas positivas al unirse a un DNA covalentemente

cerrado y tratado con topoisomerasa I (Freire *et al.*, 1996). Sin embargo, al ser h_c (11) menor que la de $\Phi 29$ (12) pero mayor que la repetición helicoidal absoluta, H_c (10.5), el superenrollamiento inducido por unidad de longitud sería menor y por tanto su afinidad por el DNA no sería tan dependiente de superenrollamiento. No obstante, estos razonamientos serían únicamente válidos si otros parámetros que determinan la topología de un DNA, como el *Twist*, se mantienen constantes. De esta forma, siendo la dependencia de superenrollamiento en la interacción de la proteína p6 de GA-1 con el DNA mucho menor que la de $\Phi 29$, debe ser suficiente para poder discriminar el DNA viral del plasmídico (Figura 49) y del genómico celular. No obstante, aunque se ha propuesto que el superenrollamiento es la principal variable que dirige la especificidad de la interacción de la proteína p6 de $\Phi 29$ con el DNA viral *in vivo*, no se pueden descartar la influencia de otros aspectos de la bioquímica celular y viral que también podrían ser importantes, al menos en el caso del bacteriófago GA-1, en la modulación de la interacción p6-DNA:

- el nucleoide de la célula huésped se encuentra ya organizado mediante la unión de proteínas celulares al producirse el comienzo de la infección viral, con lo que sólo determinadas regiones del DNA genómico celular, no asociadas con proteínas organizadoras del nucleoide serían susceptibles de interaccionar con moléculas de p6, que de esta forma no quedarían disponibles para el fago.

- La replicación de $\Phi 29$ ocurre asociada a membrana (Ivarie y Pène, 1973) como probablemente ocurre con la del fago GA-1. En *B. subtilis* los ribosomas se encuentran localizados en la periferia celular, excluidos del nucleoide (Lewis *et al.*, 2000). Esta organización también se encuentra, probablemente, en *Bacillus* sp. G1R por lo que la traducción de la proteína p6 ocurriría en un dominio subcelular próximo a la membrana plasmática. Una vez sintetizada, la proteína p6 podría unirse preferentemente al DNA viral adyacente, teniendo pocas oportunidades de interaccionar con el nucleoide celular.

- La elevada cantidad de proteína p6 sintetizada durante la infección por los fagos $\Phi 29$ y GA-1 (Abril *et al.*, 1997; Horcajadas *et al.*, 2001), permitiría ocupar de forma completa todos los sitios de unión de las moléculas de DNA viral replicadas (Abril *et al.*, 1997). De esta forma, a lo largo del proceso

evolutivo, estos fagos podrían haber terminado sintetizando cantidades excedentes de proteína p6, teniendo en cuenta que parte de esta proteína no queda disponible para el fago al interactuar con el nucleóide celular.

-Finalmente, los extremos del DNA genómico de GA-1 presentan numerosas ORFs que no están presentes en $\Phi 29$. Estas proteínas putativas estarían involucradas en aspectos hasta ahora desconocidos del desarrollo de GA-1 y no se puede excluir la posibilidad de que alguna de ellas esté involucrada en la modulación de la interacción p6-DNA.

En *B. subtilis* 110NA, la proteína p6 de GA-1 es capaz de unirse al DNA de $\Phi 29$ *in vivo* (Figuras 52 y 54), aunque en el nucleocomplejo formado no se detecta unión preferencial por los extremos genómicos ni capacidad de trans-complementar al mutante de $\Phi 29$ *sus6*(626) (Figura 53); esto indica que aunque la proteína se une al DNA heterólogo *in vivo*, el nucleocomplejo formado no tiene la conformación adecuada para permitir el correcto devenir de la infección viral. La región del DNA de $\Phi 29$ a la que peor se une *in vivo* la proteína p6 de GA-1 es la región $\Phi 2$ involucrada en el control transcripcional (Figura 54), situación análoga a la descrita para la p6 de $\Phi 29$ tanto *in vivo* (Figuras 21, 23 y 54A), como *in vitro* (Figura 35). Sin embargo, cuando se analiza la unión de la proteína p6 de GA-1 al DNA de GA-1 *in vivo* (Figura 49), la unión más baja no se aprecia por la región involucrada en el control transcripcional, GA2, sino por la región GA3, localizada en el gen 10. Estos resultados sugieren que en la región GA2 la curvatura intrínseca descrita en $\Phi 29$ (localizada en la región $\Phi 2$ y en la secuencia 5.1), podría estar ausente y por ello no se dificulta la unión de la proteína p6 de GA-1 a esta región con respecto a la región análoga en $\Phi 29$ (región $\Phi 2$). Este fenómeno implicaría la existencia de diferencias en la regulación de la transcripción con respecto a $\Phi 29$ como sugieren trabajos previos (Horcajadas, 2000).

En el entorno intracelular de *Bacillus* sp. G1R, la proteína p6 de $\Phi 29$ es capaz de interactuar con el extremo derecho del genoma de GA-1 (región GA5, Figura 55) y mantiene la dependencia de superenrollamiento en su interacción con el DNA viral y plasmídico (Figura 55 y 56). Además, en presencia de cloramfenicol, no se detecta unión de la proteína al extremo genómico izquierdo de GA-1 (región GA-1, Figura 55), sugiriendo que el mecanismo de inyección del DNA del fago GA-1 es también bifásico, como se

ha descrito para el de $\Phi 29$ (González-Huici *et al.*, 2004b), y que requeriría la expresión de proteínas virales a partir del promotor C2.

3. APLICACIÓN DEL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN p6-DNA: IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA TEMPRANA p16.7 EN EL PROCESO DE INYECCIÓN DEL DNA VIRAL

Un paso crítico durante el comienzo de la infección de los bacteriófagos es la inyección del genoma viral hacia el interior de la célula hospedadora. El conocimiento cada vez más detallado de los mecanismos de inyección de los genomas virales tiene gran relevancia no sólo para poder combatir las infecciones víricas, sino porque estos estudios han permitido, en muchas ocasiones, descubrir y caracterizar mecanismos celulares previamente desconocidos. En el caso del bacteriófago $\Phi 29$ de *B. subtilis*, el genoma lineal del fago penetra con una polaridad desde el extremo derecho hacia el extremo izquierdo mediante un mecanismo bifásico que se ha denominado “*push-pull*” (González-Huici *et al.*, 2004b). Durante la primera etapa del proceso de inyección (*push*) aproximadamente el 65% del genoma viral es internalizado en la célula infectada, supuestamente gracias a la energía acumulada en el DNA altamente empaquetado en el interior de la cápsida viral (Smith *et al.*, 2001; González-Huici *et al.*, 2004b), como se ha propuesto en la mayoría de los casos (Letellier *et al.*, 2004); si bien otros fagos como el fago T7 de *E. coli* inyectan su DNA de forma prácticamente completa mediante un proceso catalizado enzimáticamente (Molineux, 2001; Kemp *et al.*, 2004). La internalización eficiente de la parte izquierda del genoma, llamada etapa de *pull*, requiere la síntesis de al menos la proteína viral p17 (González-Huici *et al.*, 2004b), codificada en el operón derecho que se encuentra bajo el control transcripcional del promotor C2. La capacidad de la proteína p6 para unirse al DNA de $\Phi 29$ permitió desarrollar un ensayo de X-ChIP combinado con PCR en tiempo real para monitorizar el proceso de inyección del DNA. En estos experimentos, la proteína p6 se sintetizó ectópicamente en células de *B. subtilis* antes de la infección a partir del plásmido pPR55w6. Bajo estas condiciones, la proteína p16.7 no pareció jugar un papel significativo en la etapa de *pull*. Sin embargo, la proteína p6 reprime el promotor C2 provocando

una reducción drástica de la síntesis de proteínas codificadas en el operón derecho cuando es expresada ectópicamente (Figura 57). Este resultado, junto con el hecho de que la etapa de *pull* se encuentra impedida en el mutante *sus17(112)*, mientras que en células tratadas con cloramfenicol está completamente bloqueada (González-Huici *et al.*, 2004b), planteó la posibilidad de que la proteína p16.7 pudiese tener un papel en la etapa de *pull*. De esta forma la eficiencia de la etapa de *pull* se analizó usando células no productoras de proteína p6 en donde el operón temprano derecho puede alcanzar niveles de expresión salvajes. Como primera aproximación se determinó la cinética de síntesis de proteína p6 en células infectadas con los fagos mutantes *sus3(91)*, *sus16.7(48)* y *sus17(112)*. Los resultados mostraron que la síntesis de la proteína p6, cuyo gen se encuentra localizado en el operón temprano izquierdo que es internalizado durante la etapa de *pull*, se encuentra retrasada en ausencia de p16.7 (Figura 60). Esta conclusión fue confirmada mediante una aproximación adicional en la cual se monitorizó la entrada del DNA viral mediante X-ChIP y PCR en tiempo real. Para ello, se midió la unión de la proteína p6 codificada por los fagos infectantes *sus3(91)*, *sus14(1242)*, *sus16.7(48)* y *sus17(112)*, a los extremos derecho e izquierdo del genoma viral a distintos tiempos post-infección. Los resultados indicaron que se requiere la proteína p16.7 para la ejecución eficiente de la etapa de *pull* (Tabla 5, figura 63). Los experimentos anteriores se llevaron a cabo usando en paralelo los mutantes *sus16.7(48)* y *sus17(112)* con la intención de poder comparar los efectos de p16.7 y p17 en la etapa de *pull* en células no productoras de p6. Los resultados obtenidos mediante las dos aproximaciones experimentales descritas, mostraron que la ausencia de la proteína p17 afecta más severamente a la etapa de *pull* que la ausencia de p16.7. En conjunto, los resultados recogidos en el capítulo 3 de esta tesis doctoral, demuestran que la proteína p16.7, además de la proteína p17, es necesaria para que la etapa de *pull* de la inyección del DNA viral se lleve a cabo eficientemente.

La proteína p16.7 es una proteína de membrana dimérica con capacidad de unirse a DNA. Los datos estructurales disponibles estarían de acuerdo con la participación de p16.7 en el anclaje del DNA de $\Phi 29$ a la cara interna de la membrana plasmática de la célula infectada. Curiosamente, 16.7 parece ser el único gen presente en el operón temprano derecho que codifica una proteína

de membrana. Así, la proteína p17 ha resultado tener una distribución citosólica (Crucitti *et al.*, 1998; Meijer *et al.*, 2001b) mientras que el análisis de las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes putativos de este operón no indica que exista otra proteína de membrana (W. Meijer; resultados sin publicar). La transcripción del operón temprano derecho dirigida por el promotor C2, necesaria para que se produzca la etapa de *pull*, es llevada a cabo por parte de la RNA polimerasa de *B. subtilis*. Estudios de localización *in vivo* mediante fluorescencia han determinado que la mayor parte de las moléculas de RNA polimerasa están distribuidas en el nucleóide, mientras que los ribosomas se localizan fundamentalmente en la periferia celular. De esta forma, transcripción y traducción ocurren, predominantemente, en dominios subcelulares separados (Lewis *et al.*, 2000). Por lo tanto, una vez internalizado el extremo derecho del fago (R), es necesario que el promotor C2 quede accesible a la RNA polimerasa celular para poder ser transcrito. Si este fenómeno ocurre en la interfase entre los dominios de transcripción y traducción, se puede producir el acoplamiento de los procesos de transcripción, traducción e inserción en la membrana (fenómeno descrito en Ryter y Chang, 1975; Chang *et al.*, 1979; Woldringh *et al.*, 1995; y Cordes *et al.*, 1996). Esta situación podría ocurrir con la proteína p16.7 ya que tiene una región transmembrana (TM) en su extremo N-terminal que es responsable de la localización en la membrana plasmática (Meijer *et al.*, 2001b). La Figura 75 ilustra esta hipótesis. Como resultado del acoplamiento, el extremo derecho del DNA de $\Phi 29$ (internalizado durante la etapa de *push*) quedaría posicionado en la membrana plasmática o en sus cercanías donde sería subsecuentemente unido por la proteína p16.7, además de anclado a la membrana a través de la proteína terminal. De esta forma, la asociación de esta parte del genoma viral con la cara interna de la membrana celular estaría estimulada por la proteína p16.7, y contribuiría a la formación y/o organización de un complejo funcional, incluyendo al menos a la proteína p17, que sería responsable de la internalización del resto del genoma. Esta posibilidad implicaría que la etapa de *pull* del proceso de inyección del DNA de $\Phi 29$ es un proceso asociado a membrana y que, a su vez, podría estar acoplado a la organización del genoma viral en la membrana. Esta hipótesis se encuentra apoyada por las siguientes evidencias experimentales: aunque el DNA de $\Phi 29$ es una molécula

lineal, se encuentra restringido topológicamente (Figuras 23 y 24) y la alteración de la conformación topológica que sufre este DNA en presencia de novobiocina, bloquea completamente la etapa de *pull* (González-Huici *et al.*, 2006). Además, durante el proceso de infección viral, la replicación del DNA de $\Phi 29$ ocurre asociada a la membrana (Ivarie y Pène, 1973; Bravo y Salas, 1997; Meijer *et al.*, 2000).

Otra observación interesante es que aunque la transcripción dirigida por el promotor C2 se reprime por la proteína p6, la ventana temporal durante la cual se expresa el operón temprano derecho, permite sintetizar un elevado número de moléculas de p16.7 y p17, estimado en 50000 y 100000 copias por célula infectada, respectivamente (Crucitti *et al.*, 1998; Meijer *et al.*, 2001b). No parece probable que un número tan elevado de copias de ambas proteínas sea necesario únicamente para la internalización de la parte izquierda del genoma de $\Phi 29$ durante la infección. Este razonamiento se basa en las siguientes observaciones. En primer lugar, en el caso de que las proteínas p16.7 y p17 estuviesen involucradas únicamente en la etapa de *pull*, se esperaría que estas proteínas estuviesen localizadas específicamente en el lugar donde se produce la entrada del genoma viral, o cerca de él. Sin embargo, se ha podido comprobar que la proteína p16.7 localiza en varios puntos distribuidos a lo largo de la periferia celular (Meijer *et al.*, 2000), mientras que la proteína p17 presenta una localización muy próxima a la membrana, siguiendo un patrón helicoidal que recuerda mucho al de algunas proteínas del citoesqueleto de *B. subtilis* (Muñoz-Espín, resultados sin publicar). En segundo lugar, en el sistema experimental donde la proteína p6 es expresada ectópicamente, la etapa de *pull* está afectada drásticamente en ausencia de p17, en comparación con las condiciones en las cuales sí se expresa la proteína p17 (González-Huici *et al.*, 2004b). Se ha mostrado que bajo estas condiciones los niveles de proteína p17 se encuentran muy disminuidos (al igual que ocurre con p16.7) en comparación con la situación salvaje (Figura 57); sin embargo, son suficientes para llevar a cabo la etapa de *pull* (aunque con un retraso de 20 minutos, González-Huici *et al.*, 2004b), sugiriendo que sólo un número reducido de moléculas de p17 (y por el mismo razonamiento de p16.7) están involucradas en este proceso. A medida que avanza la infección viral, se sintetiza una mayor cantidad de proteínas p16.7 y p17 lo que podría indicar que estas

proteínas también intervienen en algún otro proceso donde se necesiten en mayor número de copias que las requeridas para el proceso de inyección.

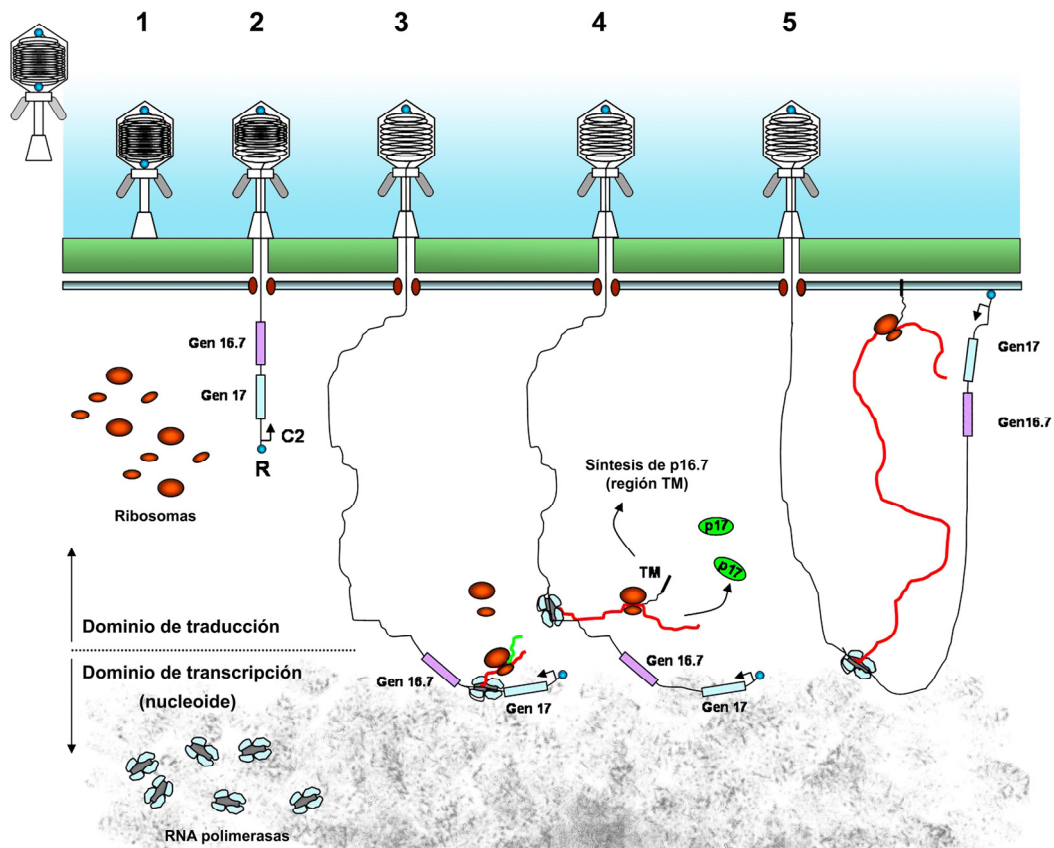


Figura 75. Posible mecanismo por el cual la proteína p16.7 podría estar involucrada en el proceso de inyección del DNA viral. 1: El fago se adsorbe de manera irreversible sobre la superficie de la célula huésped. 2: La proteína terminal (TP, en azul), degrada el peptidoglicano y el extremo genómico derecho (R) se trasloca al espacio intracelular a través de un hipotético canal de membrana (elipsoides marrones). 3: El promotor C2 podría ser transcrito por la RNA polimerasa de *B. subtilis* en la interfase entre los dominios de traducción (periferia celular) y transcripción (nucleoide, sombreado en gris). De esta forma se posibilitaría el acoplamiento transcripción-traducción. La primera proteína en traducirse es p17 (verde). 4: Comienzo de la síntesis del extremo N-terminal de p16.7, que contiene una región transmembrana (TM), altamente hidrofóbica. 5: La región TM se inserta en la membrana mientras el acoplamiento transcripción-traducción sigue teniendo lugar. El RNA mensajero se muestra en rojo, el gen 16.7 en violeta y el gen 17 en turquesa.

Para la proteína p17 podría tener relación con el mantenimiento de una correcta topología del DNA viral, como se ha indicado en el apartado 1.3 del capítulo 1. Para el caso de la proteína p16.7 se ha mostrado que se requiere para una redistribución eficiente de la replicación del fago a múltiples sitios localizados en la membrana. Además, p16.7 y p17, son necesarias para una replicación óptima del DNA de $\Phi 29$ *in vivo* (Figuras 26 y 64). Por lo tanto, ambas proteínas estarían involucradas en dos procesos distintos del ciclo vital del bacteriófago $\Phi 29$: internalización activa de la parte izquierda del genoma

viral durante el proceso de inyección, y asociación (indirecta, en el caso de p17) a la membrana de la replicación *in vivo* del DNA de $\Phi 29$.

4. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO p6-DNA MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA. EFECTO DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR EN LA FORMACIÓN DEL NUCLEOCOMPLEJO p6-DNA

Mediante técnicas de ultracentrifugación analítica, en sus modalidades de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación, se ha podido describir la asociación p6-DNA en términos de la función empírica de Hill, a partir de la cual se han podido determinar las constantes de afinidad de la proteína p6 por el DNA genómico de $\Phi 29$ así como por el extremo izquierdo de este DNA (L) (Figuras 66 y 69), encontrándose una alta correlación con los datos determinados a partir de experimentos de apantallamiento de la fluorescencia. El análisis de la cooperatividad de la interacción de la proteína p6 con estos DNAs ha indicado que se trata de una cooperatividad ligeramente positiva (con valores de los índices de Hill próximos a 1). Este resultado estaría de acuerdo con un mecanismo de unión en el que, una vez que se unen las primeras moléculas de p6 a una secuencia de DNA, las subsiguientes se unirían a los sitios adyacentes a los ocupados por las primeras, en vez de posicionarse al azar en el resto de la secuencia. Este fenómeno podría tener gran importancia en la función que tiene la proteína p6 en la activación de la iniciación de la replicación del DNA de $\Phi 29$. Las secuencias de DNA por las que la proteína ha demostrado tener más afinidad, tanto *in vivo* como *in vitro*, se localizan en ambos extremos del genoma viral (Figuras 21, 23, 30 y 35), donde también se encuentran los orígenes de replicación del fago. Resulta lógico pensar que las primeras regiones del DNA viral a las que se uniría la proteína p6 *in vivo*, son los extremos genómicos, donde se estimularía la iniciación de la replicación y se provocaría la represión del promotor C2, localizado en el extremo derecho. A continuación, estas regiones actuarían como centros de nucleación para la unión de nuevas moléculas de p6, de forma que se irían ocupando los sitios adyacentes localizados hacia el interior del DNA viral. Los análisis de la asociación p6-DNA mediante

ultracentrifugación también han permitido determinar la estequiometría de la interacción, es decir el número de moléculas de proteína unidas al DNA en cada situación en función de la concentración total de proteína. Si se alcanza la concentración suficiente de p6, tanto en el DNA genómico como en el extremo genómico izquierdo (L), es posible que la proteína forme un nucleocomplejo a lo largo de toda la secuencia sin que quede ningún sitio de unión libre en el DNA.

El primer abordaje del estudio de la estructura del complejo p6-DNA en solución, se ha llevado a cabo mediante experimentos de velocidad de sedimentación, con el objetivo de caracterizar sus propiedades hidrodinámicas. Como se puede observar en la Tabla 6, la relación friccional determinada para el nucleocomplejo formado con el extremo genómico izquierdo (p6-L), tiene un valor menor que la del DNA sólo. Estos resultados indican que el DNA se compacta al formar parte del nucleocomplejo y están de acuerdo con estudios previos en los que se ha observado, mediante microscopía electrónica, la compactación del DNA inducida por p6 (Gutiérrez *et al.*, 1994). Este comportamiento está de acuerdo con el que se esperaría de una proteína tipo *histone-like*, involucrada en la organización y compactación del genoma del bacteriófago $\Phi 29$.

Para definir con mayor detalle la compactación experimentada en solución por el DNA acomplejado con proteína, se están realizando estudios de modelado hidrodinámico avanzado, empleándose el programa HYDRO (García de la Torre *et al.*, 1994). Este programa permite calcular las propiedades hidrodinámicas de macromoléculas (en nuestro caso se trataría del complejo p6-DNA) utilizando la metodología definida como "*bead modelling*". Esta aproximación tiene dos variantes. Una de ellas se denomina *bead modelling* en un sentido estricto, en la que la superficie de la macromolécula problema se simula como un conjunto de partículas esféricas, con la condición de que el tamaño y forma de la partícula simulada sea lo más parecido a la macromolécula real. La otra variante se denomina *shell modeling*, y en ella la superficie de la macromolécula se simula mediante un conjunto de partículas de pequeño tamaño denominados *minibeads*. El primer paso para utilizar el programa HYDRO es construir un modelo tridimensional, basado en alguna de las metodologías anteriores, a partir del cual se pueden calcular parámetros

hidrodinámicos como el coeficiente de sedimentación. En la Figura 76 se muestran, como ejemplo de funcionamiento del programa, varios modelos que simulan la estructura tridimensional del extremo genómico izquierdo (L). Estos análisis, junto con otro tipo de información adicional como la que se puede obtener de la propiedades de difusión rotacional de los complejos, mediante experimentos de fluorescencia con resolución temporal, permitirán elaborar un modelo estructural del nucleocomplejo p6-DNA en solución. Además, actualmente el grupo del Doctor Miquel Coll está intentando resolver la estructura tridimensional de la proteína, tanto sola como unida al DNA, mediante cristalografía y difracción de rayos-X.

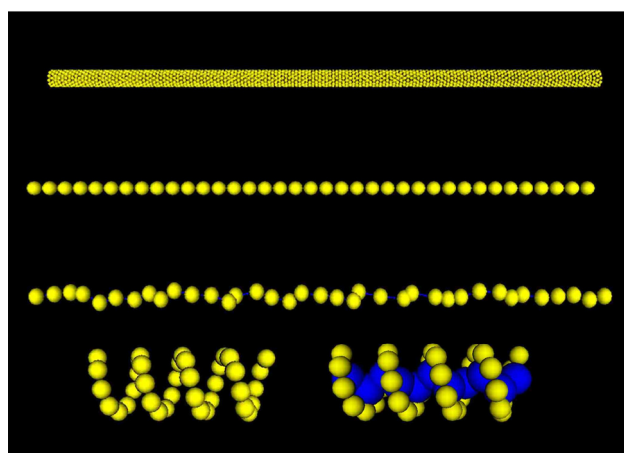
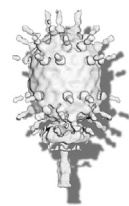


Figura 76. Modelos tridimensionales para el extremo genómico izquierdo de $\Phi 29$ generados a partir del programa HYDRO. La estructura tridimensional de la secuencia de 259 pb correspondiente al extremo genómico izquierdo se ha simulado mediante numerosas esferas de pequeño tamaño (*shell model*). Los siguientes modelos se han realizado a partir del alineamiento de 37 esferas rígidas o admitiendo cierto grado de flexibilidad entre las esferas (*bead model*). Abajo se representa la estructura que tendría el DNA sólo (izquierda) al estar formando parte del complejo p6-DNA (según los parámetros calculados en Serrano *et al.*, 1993a) o junto con la proteína p6 (en azul, derecha). Para la elaboración de estos modelos es necesario definir las coordenadas cartesianas de los centros de cada una de las esferas empleadas así como su radio de Stokes (parámetro integrado en la fórmula de Stokes que describe el movimiento de un cuerpo en el seno de un fluido). El programa permite calcular los coeficientes de sedimentación de las estructuras generadas, y su comparación con los coeficientes obtenidos experimentalmente permite estimar el grado de validez del modelo tridimensional, en función de las diferencias existentes entre ambos tipos de valores.

Finalmente, el análisis de la interacción p6-DNA mediante técnicas de ultracentrifugación no sólo ha permitido caracterizar la asociación en términos de un esquema termodinámico de asociación, sino que también ha permitido visualizar la influencia de la aglomeración macromolecular en esta interacción. Así, las medidas y el análisis del equilibrio de sedimentación en condiciones de no idealidad, recientemente introducido por Rivas y Minton (2004), han permitido utilizar la técnica de equilibrio de sedimentación para medir las

propiedades de asociación de la proteína p6 al extremo genómico del DNA de $\Phi 29$, en presencia de alta concentración del agente aglomerante dextrano T-10 y fuerza iónica elevada (Figuras 70 y 71). El fenómeno de la aglomeración macromolecular tiene gran relevancia biológica ya que afecta a la organización estructural del DNA así como a las interacciones proteína-DNA, influyendo por tanto, en la funcionalidad de los genomas (Zimmerman, 1993; Zimmerman y Murphy, 1996). También es un factor importante en la modulación de las interacciones proteína-DNA *in vivo*, donde las variaciones en la osmolaridad del medio se traducen en vastos cambios de la fuerza iónica intracelular, que a su vez son consecuencia de las variaciones sufridas en la concentración del agua libre citoplásmica (Record *et al.*, 1998). La interacción p6-DNA está fuertemente afectada por la fuerza iónica; sin embargo, en presencia del agente aglomerante dextrano T-10, es posible atenuar esta dificultad (Figura 71). Estos resultados están de acuerdo con el papel que se ha atribuido a la aglomeración macromolecular, como un mecanismo de compensación esencial que regularía las interacciones macromoleculares frente a los cambios experimentados en las concentraciones iónicas intracelulares. Por lo tanto, el estudio de interacciones en condiciones de aglomeración macromolecular, puede ser gran utilidad para la cuantificación de los procesos bioquímicos que tienen lugar en este tipo de medios y para un conocimiento más completo de los procesos fisiológicos celulares.

Conclusiones

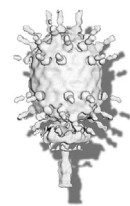


CONCLUSIONES:

1. La proteína p6 del bacteriófago $\Phi 29$ se une *in vivo* a todas las regiones analizadas del DNA genómico viral. Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que la proteína p6 organiza el genoma viral actuando a modo de *histone-like*.
2. La afinidad de la proteína p6 *in vivo* e *in vitro* no es la misma para las distintas regiones del genoma viral, siendo superior por los extremos del DNA de $\Phi 29$ y GA-1 en comparación con la observada por las secuencias internas. Este fenómeno está probablemente relacionado con el hecho de que la replicación del DNA de estos fagos, para la cual p6 es imprescindible, comienza por los extremos del genoma viral.
3. La alternancia de máximos y mínimos de curvabilidad cada 6 pb en una secuencia de DNA favorece la unión de la proteína p6 de $\Phi 29$, frente a otras periodicidades de la curvabilidad. Estas señales están presentes en ambos extremos del genoma de $\Phi 29$, lo que podría explicar la mayor afinidad de p6 por estas regiones.
4. La interacción p6-DNA de $\Phi 29$ es fuertemente dependiente del grado de superenrollamiento del DNA. Estos resultados han mostrado que la girasa celular es necesaria para la replicación del DNA de $\Phi 29$, indicando que aunque no covalentemente cerrado, se encuentra restringido topológicamente *in vivo*, probablemente debido a su asociación con la membrana celular a través de la proteína terminal y otras proteínas virales como p1 y p16.7.
5. Las proteínas p1 y p17 se requieren para el mantenimiento de una correcta topología del DNA de $\Phi 29$. La replicación del DNA viral está muy afectada en su ausencia, probablemente debido al impedimento de p6 para unirse al DNA de $\Phi 29$.
6. La unión a DNA *in vivo* de la proteína p6 del bacteriófago GA-1 es mucho menos dependiente de superenrollamiento que la de $\Phi 29$.

7. La proteína p6 de GA-1 es capaz de unirse al DNA de $\Phi 29$ *in vivo*, aunque no es capaz de trans-complementar una mutación en el gen 6 de $\Phi 29$.
8. La interacción p6-DNA ha servido como herramienta para profundizar en el conocimiento del mecanismo de inyección del DNA de $\Phi 29$. Así, se ha podido determinar que la proteína p16.7 es necesaria para el desarrollo eficiente de la etapa de *pull*.
9. El análisis de la interacción p6-DNA mediante ultracentrifugación analítica ha permitido describir la asociación en términos de la función empírica de Hill, determinándose su estequiometría y cooperatividad.
10. Los análisis hidrodinámicos del complejo p6-L han indicado que la proteína p6 compacta el DNA en solución, de acuerdo con el comportamiento esperado de una proteína *histone-like*.
11. La interacción p6-DNA está fuertemente influenciada por la fuerza iónica. Esta dependencia puede ser atenuada en condiciones de aglomeración macromolecular. Este efecto sería responsable de la regulación de la interacción frente a cambios intracelulares en la fuerza iónica.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A.M., Salas, M., Andreu, J.M., Hermoso, J.M. y Rivas, G. (1997) Phage Φ 29 protein p6 is in a monomer-dimer equilibrium that shifts to higher association states at the millimolar concentrations found *in vivo*. *Biochemistry*, **36**, 11901-11908.
- Abril, A.M., Marco, S., Carrascosa, J.L., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1999) Oligomeric structures of the phage Φ 29 histone-like protein p6. *J Mol Biol*, **292**, 581-588.
- Ackermann, H.W. (1998) Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*. *Adv Virus Res*, **51**, 135-201.
- Albert, A., Muñoz-Espín, D., Jiménez, M., Asensio, J.L., Hermoso, J.A., Salas, M. y Meijer, W.J. (2005) Structural basis for membrane anchorage of viral Φ 29 DNA during replication. *J Biol Chem*, **280**, 42486-42488.
- Alberts, B. (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, **92**, 291-294.
- Alma, N.C., Harmsen, B.J., de Jong, E.A., Ven, J. y Hilbers, C.W. (1983) Fluorescence studies of the complex formation between the gene 5 protein of bacteriophage M13 and polynucleotides. *J Mol Biol*, **163**, 47-62.
- Arwert, F. y Venema, G. (1974) Protease-sensitive transfection of *Bacillus subtilis* with bacteriophage GA-1 DNA: a probable case of heterologous transfection. *J Virol*, **13**, 584-589.
- Asensio, J.L., Albert, A., Muñoz-Espín, D., González, C., Hermoso, J., Villar, L., Jiménez-Barbero, J., Salas, M. y Meijer, W.J. (2005) Structure of the functional domain of Φ 29 replication organizer: insights into oligomerization and DNA binding. *J Biol Chem*, **280**, 20730-20739.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. y Struhl, K. (1990) Current Protocols in Molecular Biology. (John Wiley e hijos, eds.) NY.
- Ávila, J., Perucho, M. y López-Otín, C. (2003) El fago Φ 29 y los orígenes de la Biología Molecular en España. Biblioteca de Ciencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España.

- Azam, T.A., Hiraga, S. y Ishihama, A. (2000) Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes to Cells*, **5**, 613-626.
- Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R. y Rouvière-Yaniv, J. (2001) The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol Microbiol*, **39**, 1069-1079.
- Barthelemy, I., Mellado, R.P. y Salas, M. (1989) *In vitro* transcription of bacteriophage $\Phi 29$ DNA: inhibition of early promoters by the viral replication protein p6. *J Virol*, **63**, 460-462.
- Barthelemy, I. y Salas, M. (1989) Characterization of a new prokaryotic transcriptional activator and its DNA recognition site. *J Mol Biol*, **208**, 225-232.
- Ben-Yehuda, S., Fujita, M., Liu, X.S., Gorbatyuk, B., Skoko, D., Yan, J., Marko, J.F., Liu, J.S., Eichenberger, P., Rudner, D.Z. y Losick, R. (2005) Defining a centromere-like element in *Bacillus subtilis* by identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA. *Mol Cell*, **17**, 773-782.
- Betermier, M., Rousseau, P., Alazard, R. y Chandler, M. (1995) Mutual stabilisation of bacteriophage Mu repressor and histone-like proteins in a nucleoprotein structure. *J Mol Biol*, **249**, 332-341.
- Bjornsti, M.A., Reilly, B.E. y Anderson, D.L. (1983) Morphogenesis of bacteriophage $\Phi 29$ of *Bacillus subtilis*: oriented and quantized *in vitro* packaging of DNA protein gp3. *J Virol*, **45**, 383-396.
- Blanco, L. y Salas, M. (1984) Characterization and purification of a phage $\Phi 29$ -encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 5325-5329.
- Blanco, L., Gutiérrez, J., Lázaro, J.M., Bernad, A. y Salas, M. (1986) Replication of phage $\Phi 29$ DNA *in vitro*: role of the viral protein p6 in initiation and elongation. *Nucleic Acids Res*, **14**, 4923-4937.
- Blanco, L., Prieto, I., Gutiérrez, J., Bernad, A., Lázaro, J.M., Hermoso, J.M. y Salas, M. (1987) Effect of NH_4^+ ions on $\Phi 29$ DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. *J Virol*, **61**, 3983-3991.

- Blanco, L., Bernad, A. y Salas, M. (1988) Transition from initiation to elongation in protein-primed Φ 29 DNA replication: salt-dependent stimulation by the viral protein p6. *J Virol*, **62**, 4167-4172.
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J.M., Martín, G., Garmendia, C. y Salas, M. (1989) Highly efficient DNA synthesis by the phage Φ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*, **264**, 8935-8940.
- Blanco, L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Bonnin, A. y Salas, M. (1994) Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 12198-12202.
- Bradley, D.E. (1965) The isolation and morphology of some new bacteriophages specific for *Bacillus* and *Acetobacter* species. *J Gen Microbiol*, **41**, 233-241.
- Bravo, A., Hermoso, J.M. y Salas, M. (1994) A genetic approach to the identification of functional amino acids in protein p6 of *Bacillus subtilis* phage Φ 29. *Mol Gen Genet*, **245**, 529-536.
- Bravo, A. y Salas, M. (1997) Initiation of bacteriophage Φ 29 DNA replication *in vivo*: Assembly of a membrane-associated multiprotein complex. *J Mol Biol*, **269**, 102-112.
- Bravo, A. y Salas, M. (1998) Polymerization of bacteriophage Φ 29 replication protein p1 into protofilament sheets. *EMBO J*, **17**, 6096-6105.
- Bravo, A., Illana, B. y Salas, M. (2000) Compartmentalization of phage Φ 29 DNA replication: interaction between the primer terminal protein and the membrane-associated protein p1. *EMBO J*, **19**, 5575-5584.
- Breitling, R., Sorokin, A.V. y Behnke, D. (1990) Temperature-inducible gene expression in *Bacillus subtilis* mediated by the cl857-encoded repressor of bacteriophage lambda. *Gene*, **93**, 35-40.
- Bullock, W.O. y Fernández, J.M. (1987) XL 1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, **5**, 376-378.
- Bustin, M. (1999) Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol*, **19**, 5237-5246.

- Cairns, J., Stent, G.S. y Watson, J.D. (2000) Phage and the Origins of Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Camacho, A. y Salas, M. (2000) Pleiotropic effect of protein p6 on the viral cycle of bacteriophage $\Phi 29$. *J Bacteriol*, **182**, 6927-6932.
- Camacho, A. y Salas, M. (2001) Mechanism for the switch of $\Phi 29$ DNA early to late transcription by regulatory protein p4 and histone-like protein p6. *EMBO J*, **20**, 6060-6070.
- Carrascosa, J.L., Camacho, A., Moreno, F., Jiménez, F., Mellado, R.P., Viñuela, E. y Salas, M. (1976) *Bacillus subtilis* phage $\Phi 29$; characterization of gene products and functions. *Eur J Biochem*, **66**, 229-241.
- Case, R.B., Chang, Y.P., Smith, S.B., Gore, J., Cozzarelli, N.R. y Bustamante, C. (2004) The bacterial condensin MukBEF compacts DNA into a repetitive, stable structure. *Science*, **305**, 222-227.
- Clarey, M.G., Erzberger, J.P., Grob, P., Leschziner, A.E., Berger, J.M., Nogales, E. y Botchan, M. (2006) Nucleotide-dependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 684-690.
- Cole, J.L. (2004) Analysis of heterogeneous interactions. *Methods Enzymol*, **384**, 212-232.
- Constantinou, A., Voelkel-Meiman, K., Sternglanz, R., McCorquodale, M.M. y McCorquodale, D.J. (1986) Involvement of host DNA gyrase in growth of bacteriophage T5. *J Virol*, **57**, 875-882.
- Cordes, C., Meima, R., Twiest, B., Kazemier, B., Venema, G., van Dijl, J.M. y Bron, S. (1996) The expression of a plasmid-specified exported protein causes structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **178**, 5235-5242.
- Crucitti, P., Lázaro, J.M., Beneš, V. y Salas, M. (1998) Bacteriophage $\Phi 29$ early protein p17 is conditionally required for the first rounds of viral DNA replication. *Gene*, **223**, 135-142.
- Crucitti, P., Abril, A.M. y Salas, M. (2003) Bacteriophage $\Phi 29$ early protein p17. Self-association and hetero-association with the viral histone-like protein p6. *J Biol Chem*, **278**, 4906-4911.

- Chang, C.N., Model, P. y Blobel, G. (1979) Membrane biogenesis: cotranslational integration of the bacteriophage f1 coat protein into an *Escherichia coli* membrane fraction. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 1251-1255.
- de Jong, R.N. y van der Vliet, P.C. (1999) Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene*, **236**, 1-12.
- Dorman, C.J. (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 391-400.
- Dreiseikermann, B. (1994) Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev*, **58**, 293-316.
- Elías-Arnanz, M. y Salas, M. (1999) Functional interactions between a phage histone-like protein and a transcriptional factor in regulation of Φ 29 early-late transcriptional switch. *Genes Dev*, **13**, 2502-2513.
- Ellis, R.J. y Hartl, F.U. (1996) Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *Faseb J*, **10**, 20-26.
- Ellis, R.J. (2001) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 114-119.
- Erzberger, J.P., Mott, M.L. y Berger, J.M. (2006) Structural basis for ATP-dependent DnaA assembly and replication-origin remodeling. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 676-683.
- Freire, R., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1994) A new protein domain for binding to DNA through the minor groove. *EMBO J*, **13**, 4353-4360.
- Freire, R., Serrano, M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1996) Activation of replication origins in Φ 29-related phages requires the recognition of initiation proteins to specific nucleoprotein complexes. *J Biol Chem*, **271**, 31000-31007.
- Fujita, N. y Wade, P.A. (2004) Use of bifunctional cross-linking reagents in mapping genomic distribution of chromatin remodeling complexes. *Methods*, **33**, 81-85.
- Fulton, A.B. (1982) How crowded is the cytoplasm? *Cell*, **30**, 345-347.
- García de la Torre, J., Navarro, S., López Martínez, M.C., Díaz, F.G. y López Cascales, J.J. (1994) HYDRO: a computer program for the prediction of hydrodynamic properties of macromolecules. *Biophys J*, **67**, 530-531.

- García, L.R. y Molineux, I.J. (1996) Transcription-independent DNA translocation of bacteriophage T7 DNA into *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **178**, 6921-6929.
- Gartenberg, M.R. y Crothers, D.M. (1988) DNA sequence determinants of CAP-induced bending and protein binding affinity. *Nature*, **333**, 824-829.
- González-Huici, V., Lázaro, J.M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (2000) Specific recognition of parental terminal protein by DNA polymerase for initiation of protein-primed DNA replication. *J Biol Chem*, **275**, 14678-14683.
- González-Huici, V., Alcorlo, M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (2004a) Binding of phage Φ 29 architectural protein p6 to the viral genome: evidence for topological restriction of the phage linear DNA. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3493-3502.
- González-Huici, V., Salas, M. y Hermoso, J.M. (2004b) The push-pull mechanism of bacteriophage Φ 29 DNA injection. *Mol Microbiol*, **52**, 529-540.
- González-Huici, V., Salas, M. y Hermoso, J.M. (2004c) Genome wide, supercoiling-dependent, *in vivo* binding of a viral protein involved in DNA replication and transcriptional control. *Nucleic Acids Res*, **32**, 2306-2314.
- González-Huici, V., Salas, M. y Hermoso, J.M. (2006) Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage Φ 29 DNA ejection. *Gene*, **374**, 19-25.
- Gorin, A.A., Zhurkin, V.B. y Olson, W.K. (1995) B-DNA twisting correlates with base-pair morphology. *J Mol Biol*, **247**, 34-48.
- Grunow, R., Schonherr, M., Taubeneck, U. y Zimmermann, I. (1981) Zur Struktur von Bakteriophagen aus Enzym-produzierenden *Bacillus* Kulturen. *Acta Biotechnol*, **1**, 17-19.
- Guasch, A., Parraga, A., Pous, J., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. y Coll, M. (1998) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage Φ 29 connector particle. *FEBS Letters*, **430**, 283-287.
- Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Ruth, F.X., Valpuesta, J.M., Sousa, N., Carrascosa, J.L. y Coll, M. (2002) Detailed architecture of a DNA translocating machine: The high-resolution structure of the bacteriophage Φ 29 connector particle. *J Mol Biol*, **315**, 663-676.

- Guo, P. (2002) Structure and function of $\Phi 29$ hexameric RNA that drives the viral DNA packaging motor: review. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **72**, 415-472.
- Gutiérrez, C., Martín, G., Sogo, J.M. y Salas, M. (1991) Mechanism of stimulation of DNA replication by bacteriophage $\Phi 29$ single-stranded DNA-binding protein p5. *J Biol Chem*, **266**, 2104-2111.
- Gutiérrez, C., Freire, R., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1994) Assembly of phage $\Phi 29$ genome with viral protein p6 into a compact complex. *EMBO J*, **13**, 269-276.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harvey, S.H., Krien, M.J. y O'Connell, M.J. (2002) Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins, a family of conserved ATPases. *Genome Biol*, **3**, reviews 3003.
- Hatters, D.M., Minton, A.P. y Howlett, G.J. (2002) Macromolecular crowding accelerates amyloid formation by human apolipoprotein C-II. *J Biol Chem*, **277**, 7824-7830.
- Hecht, A. y Grunstein, M. (1999) Mapping DNA interaction sites of chromosomal proteins using immunoprecipitation and polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, **304**, 399-414.
- Hermoso, J.M., Méndez, E., Soriano, F. y Salas, M. (1985) Location of the serine residue involved in the linkage between the terminal protein and the DNA of phage $\Phi 29$. *Nucleic Acids Res*, **13**, 7715-7728.
- Higgins, N.P., Yang, X., Fu, Q. y Roth, J.R. (1996) Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **178**, 2825-2835.
- Hirano, T. (1999) SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev*, **13**, 11-19.
- Holmes, V.F. y Cozzarelli, N.R. (2000) Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 1322-1324.
- Horcajadas, J.A. (2000) Control de la transcripción del bacteriófago GA-1 de *Bacillus*. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma. Madrid.

- Horcajadas, J.A., Meijer, W.J., Rojo, F. y Salas, M. (2001) Analysis of early promoters of the *Bacillus* bacteriophage GA-1. *J Bacteriol*, **183**, 6965-6970.
- Howlett, G.J. y Davidson, B.E. (2000) Analysis of interaction of regulatory protein TyrR with DNA. *Methods Enzymol*, **323**, 231-254.
- Howlett, G.J., Minton, A.P. y Rivas, G. (2006) Analytical ultracentrifugation for the study of protein association and assembly. *Curr Opin Chem Biol*, **10**, 430-436.
- Ikeda, Y., Saito, H., Miura, K., Takagi, J. y Aoki, H. (2004) DNA base composition, susceptibility to bacteriophages and interspecific transformation as criteria for classification in the genus *Bacillus*. *J Gen Appl Microbiol*, **50**, 353-362.
- Ishihama, A. (1999) Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells*, **4**, 135-143.
- Ivarie, R.D. y Pène, J.J. (1973) DNA replication in bacteriophage Φ 29: the requirement of a viral-specific product for association of Φ 29 DNA with the cell membrane of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Virology*, **52**, 351-362.
- Jiménez, F., Camacho, A., De la Torre, J., Viñuela, E. y Salas, M. (1977) Assembly of *Bacillus subtilis* phage Φ 29. 2. Mutants in the cistrons coding for the non-structural proteins. *Eur J Biochem*, **73**, 57-72.
- Kemp, P., Gupta, M. y Molineux, I.J. (2004) Bacteriophage T7 DNA ejection into cells is initiated by an enzyme-like mechanism. *Mol Microbiol*, **53**, 1251-1265.
- Krawiec, S., Jiménez, F., García, J.A., Villanueva, N., Sogo, J.M. y Salas, M. (1981) The orderly, *in vitro* emergence of DNA from bacteriophage Φ 29 particles. *Virology*, **111**, 440-454.
- Kuriyan, J. y O'Donnell, M. (1993) Sliding clamps of DNA polymerases. *J Mol Biol*, **234**, 915-925.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lakowicz, J.A. (1983) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Publishing Co. N.Y. 496.

- Lanni, Y.T. (1968) First-step-transfer deoxyribonucleic acid of bacteriophage T5. *Bacteriol Rev*, **32**, 227-242.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M. y Pelletier, S.L. (1992) Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science (Harding S, Rowe A, Horton J., eds) Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 90-125.
- Letellier, L., Plançon, L., Bonhivers, M. y Boulanger, P. (1999) Phage DNA transport across membranes. *Res Microbiol*, **150**, 499-505.
- Letellier, L., Boulanger, P., de Frutos, M. y Jacquot, P. (2003) Channeling phage DNA through membranes: from *in vivo* to *in vitro*. *Res Microbiol*, **154**, 283-287.
- Letellier, L., Boulanger, P., Plançon, L., Jacquot, P. y Santamaria, M. (2004) Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Front Biosci*, **9**, 1228-1339.
- Lewis, D.E., Geanakopulos, M. y Adhya, S. (1999) Role of HU and DNA supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex at *gal* promoters in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **31**, 451-461.
- Lewis, P.J., Thaker, S.D. y Errington, J. (2000) Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*, **19**, 710-718.
- Lin, D.C. y Grossman, A.D. (1998) Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell*, **92**, 675-685.
- Lindow, J.C., Britton, R.A. y Grossman, A.D. (2002) Structural maintenance of chromosomes protein of *Bacillus subtilis* affects supercoiling *in vivo*. *J Bacteriol*, **184**, 5317-5322.
- McGhee, J.D. y von Hippel, P.H. (1974) Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol*, **86**, 469-489.
- McGhee, J.D. y von Hippel, P.H. (1975a) Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. *Biochemistry*, **14**, 1281-1296.
- McGhee, J.D. y von Hippel, P.H. (1975b) Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases. *Biochemistry*, **14**, 1297-1303.

- McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T. y Sueoka, N. (1986) The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid*, **15**, 93-103.
- Meijer, W.J., Lewis, P.J., Errington, J. y Salas, M. (2000) Dynamic relocation of phage Φ 29 DNA during replication and the role of the viral protein p16.7. *EMBO J*, **19**, 4182-4190.
- Meijer, W.J., Horcajadas, J.A. y Salas, M. (2001a) Φ 29 family of phages. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 261-287.
- Meijer, W.J., Serna-Rico, A. y Salas, M. (2001b) Characterization of the bacteriophage Φ 29-encoded protein p16.7: a membrane protein involved in phage DNA replication. *Mol Microbiol*, **39**, 731-746.
- Meluh, P.B. y Broach, J.R. (1999) Immunological analysis of yeast chromatin. *Methods Enzymol*, **304**, 414-430.
- Mellado, R.P., Peñalva, M.A., Inciarte, M.R. y Salas, M. (1980) The protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage Φ 29 is involved in the initiation of DNA replication. *Virology*, **104**, 84-96.
- Méndez, J., Blanco, L., Esteban, J.A., Bernad, A. y Salas, M. (1992) Initiation of Φ 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: A sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 9579-9583.
- Méndez, J., Blanco, L. y Salas, M. (1997) Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *EMBO J*, **16**, 2519-2527.
- Minton, A.P. (1981) Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity. *Biopolymers*, **20**, 2093-2120.
- Minton, A.P. (1994) En Modern analytical ultracentrifugation. Shuster, T.M. y Laue, T.M. eds. Birkhauser. Boston, 81-93.
- Minton, A.P. (1998) Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods Enzymol*, **295**, 127-149.
- Minton, A.P. (2000a) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 34-39.

- Minton, A.P. (2000b) Quantitative characterization of reversible macromolecular associations via sedimentation equilibrium: an introduction. *Exp Mol Med*, **32**, 1-5.
- Minton, A.P. (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem*, **276**, 10577-10580.
- Moak, M. y Molineux, I.J. (2004) Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Mol Microbiol*, **51**, 1169-1183.
- Molineux, I.J. (2001) No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Mol Microbiol*, **40**, 1-8.
- Molineux, I.J. (2006) Fifty-three years since Hershey and Chase; much ado about pressure but which pressure is it? *Virology*, **344**, 221-229.
- Morales, P., Rouvière-Yaniv, J. y Dreyfus, M. (2002) The histone-like protein HU does not obstruct movement of T7 RNA polymerase in *Escherichia coli* cells but stimulates its activity. *J Bacteriol*, **184**, 1565-1570.
- Moreno, F., Camacho, A., Viñuela, E. y Salas, M. (1974) Suppressor-sensitive mutants and genetic map of *Bacillus subtilis* bacteriophage Φ 29. *Virology*, **62**, 1-16.
- Muñoz-Espín, D., Mateu, M.G., Villar, L., Marina, A., Salas, M. y Meijer, W.J. (2004) Phage Φ 29 DNA replication organizer membrane protein p16.7 contains a coiled-coil and a dimeric, homeodomain-related, functional domain. *J Biol Chem*, **279**, 50437-50445.
- Murray, C.L. y Rabinowitz, J.C. (1982) Nucleotide sequence of transcription and translation initiation regions in *Bacillus* phage Φ 29 early genes. *J Biol Chem*, **257**, 1053-1062.
- Muskhelishvili, G. y Travers, A. (2003) Transcription factor as a topological homeostat. *Front Biosci*, **8**, d279-285.
- Naber, D., Korte, U. y Krack, K. (1979) Content of water-soluble and total proteins in the aging human brain. *Exp Gerontol*, **14**, 59-63.
- Nagy, I., Nagy, K., Nagy, V., Kalmar, A. y Nagy, E. (1981) Alterations in total content and solubility characteristics of proteins in rat brain and liver during ageing and centrophenoxine treatment. *Exp Gerontol*, **16**, 229-240.

- Nagy, I.Z., Nagy, K. y Lustyik, G. (1982) Protein and water contents of aging brain. *Exp Brain Res*, **5**, 118-122.
- O'Donnell, M. y Jeruzalmi, D. (2006) Helical proteins initiate replication of DNA helices. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 665-667.
- Orlando, V., Strutt, H. y Paro, R. (1997) Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Methods: a companion to Methods in Enzymology*, **11**, 205-214.
- Orlando, V. (2000) Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*, **25**, 99-104.
- Otero, M.J. y Salas, M. (1989) Regions at the carboxyl end of bacteriophage $\Phi 29$ protein p6 required for DNA binding and activity in $\Phi 29$ DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **17**, 4567-4577.
- Pastrana, R., Lázaro, J.M., Blanco, L., García, J.A., Méndez, E. y Salas, M. (1985) Overproduction and purification of protein p6 of *Bacillus subtilis* phage $\Phi 29$: role in the initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **13**, 3083-3100.
- Pečenková, T. y Pačes, V. (1999) Molecular phylogeny of $\Phi 29$ -like phages and their evolutionary relatedness to other protein-primed replicating phages and other phages hosted by Gram-positive bacteria. *J Mol Evol*, **48**, 197-208.
- Peñalva, M.A. y Salas, M. (1982) Initiation of phage $\Phi 29$ DNA replication *in vitro*: formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5'-dAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**, 5522-5526.
- Pettijohn, D.E. (1982) Structure and properties of the bacterial nucleoid. *Cell*, **30**, 667-669.
- Polaczek, P., Kwan, K. y Campbell, J.L. (1998) Unwinding of the *Escherichia coli* origin of replication (*oriC*) can occur in the absence of initiation proteins but is stabilized by DnaA and histone-like proteins IHF or HU. *Plasmid*, **39**, 77-83.
- Pooley, H.M., Paschoud, D. y Karamata, D. (1987) The *gtaB* marker in *Bacillus subtilis* 168 is associated with a deficiency in UDPglucose pyrophosphorylase. *J Gen Microbiol*, **133**, 3481-3493.

- Prieto, I., Lázaro, J.M., García, J.A., Hermoso, J.M. y Salas, M. (1984) Purification in a functional form of the terminal protein of *Bacillus subtilis* phage $\Phi 29$. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 1639-1643.
- Prieto, I. (1986) Mecanismo de iniciación de la replicación del DNA del bacteriófago $\Phi 29$. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma. Madrid.
- Prieto, I., Serrano, M., Lázaro, J.M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1988) Interaction of the bacteriophage $\Phi 29$ protein p6 with double-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 314-318.
- Quisel, J.D., Lin, D.C. y Grossman, A.D. (1999) Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell*, **4**, 665-672.
- Ralston, G.B. (1990) Effects of crowding in protein solutions. *J Chem Educ*, **67**, 857-860.
- Ralston, G.B. (1993) Introduction to analytical ultracentrifugation. Beckman-Coulter, CA.
- Record, M.T., Jr., Courtenay, E.S., Cayley, S. y Guttman, H.J. (1998) Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem Sci*, **23**, 190-194.
- Reilly, B.E. (1965) A study of the bacteriophages of *Bacillus subtilis* and their infectious nucleic acids. *Ph. D. thesis*. Western Reserve University, Michigan. USA.
- Reilly, B.E., Zeece, V.M. y Anderson, D.L. (1973) Genetic study of suppressor-sensitive mutants of the *Bacillus subtilis* bacteriophage $\Phi 29$. *J Virol*, **11**, 756-760.
- Remaut, E., Stanssens, P. y Fiers, W. (1981) Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the PL promoter of coliphage lambda. *Gene*, **15**, 81-93.
- Richey, B., Cayley, D.S., Mossing, M.C., Kolka, C., Anderson, C.F., Farrar, T.C. y Record, M.T., Jr. (1987) Variability of the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. Differences between *in vitro* and *in vivo* effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression. *J Biol Chem*, **262**, 7157-7164.

- Rimsky, S. (2004) Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 109-114.
- Rivas, G., Fernández, J.A. y Minton, A.P. (1999a) Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: Theory, experiment, and biological significance. *Biochemistry*, **38**, 9379-9388.
- Rivas, G., Stafford, W. y Minton, A.P. (1999b) Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods* **19**, 194-212.
- Rivas, G., Fernández, J.A. y Minton, A.P. (2001) Direct observation of the enhancement of noncooperative protein self-assembly by macromolecular crowding: indefinite linear self-association of bacterial cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 3150-3155.
- Rivas, G., Ferrone, F. y Herzfeld, J. (2004) Life in a crowded world. *EMBO Rep*, **5**, 23-27.
- Rivas, G. y Minton, A.P. (2004) Non-ideal tracer sedimentation equilibrium: a powerful tool for the characterization of macromolecular interactions in crowded solutions. *J Mol Recognit*, **17**, 362-367.
- Rojo, F., Zaballos, A. y Salas, M. (1990) Bend induced by the phage $\Phi 29$ transcriptional activator in the viral late promoter is required for activation. *J Mol Biol*, **211**, 713-725.
- Rojo, F., Mencía, M., Monsalve, M. y Salas, M. (1998) Transcription activation and repression by interaction of a regulator with the alpha subunit of RNA polymerase: the model of phage $\Phi 29$ protein p4. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **60**, 29-46.
- Rossmann, M.G., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F. y Leiman, P.G. (2004) The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 171-180.
- Rottländer, E. y Trautner, T.A. (1970) Genetic and transfection studies with *B. subtilis* phage SP 50. I. Phage mutants with restricted growth on *B. subtilis* strain 168. *Mol Gen Genet*, **108**, 47-60.
- Ryter, A. y Chang, A. (1975) Localization of transcribing genes in the bacterial cell by means of high resolution autoradiography. *J Mol Biol*, **98**, 797-810.

- Salas, M., Mellado, R.P. y Viñuela, E. (1978) Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage $\Phi 29$. *J Mol Biol*, **119**, 269-291.
- Salas, M. (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem*, **60**, 37-71.
- Salas, M. y Rojo, F. (1993) Replication and transcription of bacteriophage $\Phi 29$ DNA, en *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics (Hoch., J. A., Losick, R. eds). American Society for Microbiology, Washington DC. 843-857.
- Salas, M., Miller, J.T., Leis, J. y DePamphilis, M.L. (1996) Mechanism for priming DNA synthesis en DNA Replication in Eukaryotic Cells (DePamphilis, M. L., ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 131-176.
- Salas, M. (1999) Mechanisms of initiation of linear DNA replication in prokaryotes. *Genet Eng* (N.Y.), **21**, 159-171.
- Salas, M. (2003) Los virus como sistema modelo de la Biología Molecular. *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat (Esp)*, **97**, 223-229.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Satchwell, S.C., Drew, H.R. y Travers, A.A. (1986) Sequence Periodicities in Chicken Nucleosome Core DNA. *J Mol Biol*, **191**, 659-675.
- Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J*, **78**, 1606-1619.
- Schwarz, G. y Watanabe, F. (1983) Thermodynamics and kinetics of co-operative protein-nucleic acid binding. I. General aspects of analysis of data. *J Mol Biol*, **163**, 467-484.
- Serna-Rico, A., Salas, M. y Meijer, W.J.J. (2002) The *Bacillus subtilis* phage $\Phi 29$ protein p16.7, involved in $\Phi 29$ DNA replication, is a membrane-localized single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem*, **277**, 6733-6742.
- Serna-Rico, A., Muñoz-Espín, D., Villar, L., Salas, M. y Meijer, W.J. (2003) The integral membrane protein p16.7 organizes *in vivo* $\Phi 29$ DNA replication

- through interaction with both the terminal protein and ssDNA. *EMBO J*, **22**, 2297-2306.
- Serrano-Heras, G., Salas, M. y Bravo, A. (2005) A new plasmid vector for regulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*, **54**, 278-282.
- Serrano-Heras, G., Salas, M. y Bravo, A. (2006) A uracil-DNA glycosylase inhibitor encoded by a non-uracil containing viral DNA. *J Biol Chem*, **281**, 7068-7074.
- Serrano, M., Gutiérrez, J., Prieto, I., Hermoso, J.M. y Salas, M. (1989) Signals at the bacteriophage Φ 29 DNA replication origins required for protein p6 binding and activity. *EMBO J*, **8**, 1879-1885.
- Serrano, M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1990) A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science*, **248**, 1012-1016.
- Serrano, M., Gutiérrez, C., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1993a) Superhelical path of the DNA in the nucleoprotein complex that activates the initiation of phage Φ 29 DNA replication. *J Mol Biol*, **230**, 248-259.
- Serrano, M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1993b) Multimeric complexes formed by DNA-binding proteins of low sequence specificity. *Trends Biochem Sci*, **18**, 202-206.
- Serrano, M., Gutiérrez, C., Freire, R., Bravo, A., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1994) Phage Φ 29 protein p6: A viral histone-like protein. *Biochimie*, **76**, 981-991.
- Shimizu, N., Miura, K. y Aoki, H. (1970) Characterization of *Bacillus subtilis* bacteriophage. II. Isolation and morphology of phage Nf and properties of its DNA. *J Biochem (Tokyo)*, **68**, 277-286.
- Shtilerman, M.D., Ding, T.T. y Lansbury, P.T., Jr. (2002) Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry*, **41**, 3855-3860.
- Simpson, A.A., Tao, Y.Z., Leiman, P.G., Badasso, M.O., He, Y.N., Jardine, P.J., Olson, N.H., Morais, M.C., Grimes, S., Anderson, D.L., Baker, T.S. y Rossmann, M.G. (2000) Structure of the bacteriophage Φ 29 DNA packaging motor. *Nature*, **408**, 745-750.

- Sinden, R.R. y Pettijohn, D.E. (1982) Torsional tension in intracellular bacteriophage T4 DNA. Evidence that a linear DNA duplex can be supercoiled *in vivo*. *J Mol Biol*, **162**, 659-677.
- Smith, D.E., Tans, S.J., Smith, S.B., Grimes, S., Anderson, D.L. y Bustamante, C. (2001) The bacteriophage Φ 29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, **413**, 748-752.
- Snyder, C.E., Jr. y Benzinger, R.H. (1981) Second-step transfer of bacteriophage T5 DNA: purification and characterization of the T5 gene A2 protein. *J Virol*, **40**, 248-257.
- Soengas, M.S., Esteban, J.A., Salas, M. y Gutiérrez, C. (1994) Complex formation between phage Φ 29 single-stranded DNA binding protein and DNA. *J Mol Biol*, **239**, 213-226.
- Studier, F.W. y Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Swinger, K.K. y Rice, P.A. (2004) IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 28-35.
- Tabor, S. y Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 1074-1078.
- Thanbichler, M., Viollier, P.H. y Shapiro, L. (2005a) The structure and function of the bacterial chromosome. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 153-162.
- Thanbichler, M., Wang, S.C. y Shapiro, L. (2005b) The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *J Cell Biochem*, **96**, 506-521.
- Travers, A.A. (1991) DNA bending and kinking. Sequence dependence and function. *Curr Opin Struct Biol*, **1**, 114-122.
- Uversky, N.V., Cooper, E.M., Bower, S.K., Li, J. y Fink, A.L. (2001) Accelerated α -synuclein fibrillation in crowded milieu. *FEBS Lett*, **515**, 99-103.
- van Holde, K.E. (1986) Physical Biochemistry. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, NJ. 3-23.
- Villanueva, N. y Salas, M. (1981) Adsorption of bacteriophage Φ 29 to *Bacillus subtilis* through the neck appendages of the viral particle. *J Virol*, **38**, 15-19.

- Vlček, C. y Pačes, V. (1986) Nucleotide sequence of the late region of *Bacillus* phage Φ 29 completes the 19285-bp sequence of Φ 29 genome. Comparison with the homologous sequence of phage PZA. *Gene*, **46**, 215-225.
- Wang, J.C., Peck, L.J. y Becherer, K. (1983) DNA supercoiling and its effects on DNA structure and function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **47 Pt 1**, 85-91.
- Waxman, E., Laws, W.R., Laue, T.M., Nemerson, Y. y Ross, J.B. (1993) Human factor VIIa and its complex with soluble tissue factor: evaluation of asymmetry and conformational dynamics by ultracentrifugation and fluorescence anisotropy decay methods. *Biochemistry*, **32**, 3005-3012.
- Whiteley, H.R., Ramey, W.D., Spiegelman, G.B. y Holder, R.D. (1986) Modulation of *in vivo* and *in vitro* transcription of bacteriophage Φ 29 early genes. *Virology*, **155**, 392-401.
- Woldringh, C.L., Jensen, P.R. y Westerhoff, H.V. (1995) Structure and partitioning of bacterial DNA: determined by a balance of compaction and expansion forces? *FEMS Microbiol Lett*, **131**, 235-242.
- Wolffe, A.P. y Hayes, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*, **27**, 711-720.
- Worcel, A. y Burgi, E. (1972) On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **71**, 127-147.
- Xiang, Y., Morais, M.C., Battisti, A.J., Grimes, S., Jardine, P.J., Anderson, D.L. y Rossmann, M.G. (2006) Structural changes of bacteriophage Φ 29 upon DNA packaging and release. *EMBO J*, **25**, 5229-5239.
- Yasbin, R.E., Maino, V.C. y Young, F.E. (1976) Bacteriophage resistance in *Bacillus subtilis* 168, W23, and interstrain transformants. *J Bacteriol*, **125**, 1120-1126.
- Yasbin, R.E., Fields, P.I. y Andersen, B.J. (1980) Properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives freed of their natural prophages. *Gene*, **12**, 155-159.
- Yoshikawa, H. y Ito, J. (1982) Nucleotide sequence of the major early region of bacteriophage Φ 29. *Gene*, **17**, 323-335.
- Yoshikawa, H., Garvey, K.J. y Ito, J. (1985) Nucleotide sequence analysis of DNA replication origins of the small *Bacillus* bacteriophages: evolutionary relationships. *Gene*, **37**, 125-130.

- Yoshikawa, H., Elder, J.H. y Ito, J. (1986) Comparative studies on the small *Bacillus* bacteriophages. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 39-49.
- Young, F.E. (1967) Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168. *Proc Natl Acad Sci USA*, **58**, 2377-2384.
- Zimmerman, S.B. y Trach, S.O. (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **222**, 599-620.
- Zimmerman, S.B. (1993) Macromolecular crowding effects on macromolecular interactions: some implications for genome structure and function. *Biochim Biophys Acta*, **1216**, 175-185.
- Zimmerman, S.B. y Minton, A.P. (1993) Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **22**, 27-65.
- Zimmerman, S.B. y Murphy, L.D. (1996) Macromolecular crowding and the mandatory condensation of DNA in bacteria. *FEBS Lett*, **390**, 245-248.

